



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Distribución alélica del gen *ATXN10* en una muestra de
una población quechua de Puno, Perú**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Diego Martin VÉLIZ OTANI

ASESOR

Pilar Elena MAZZETTI SOLER

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Véliz, D. (2019). *Distribución alélica del gen ATXN10 en una muestra de una población quechua de Puno, Perú*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 09:20 horas del 22 de marzo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **DIEGO MARTIN VÉLIZ OTANI**.

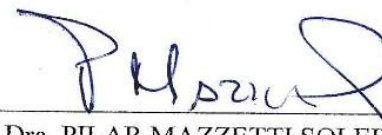
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 013-EPGB-2018, el titulando expuso su tesis: **"DISTRIBUCIÓN ALÉLICA DEL GEN *ATXN10* EN UNA MUESTRA DE UNA POBLACIÓN QUECHUA DE PUNO, PERÚ"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **DIEGO MARTIN VÉLIZ OTANI** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 10:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 22 de marzo de 2019.


Dra. MONICA PAREDES ANAYA
(PRESIDENTA)


Dra. PILAR MAZZETTI SOLER
(ASESORA)


Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO
(MIEMBRO)


Blgo. ALBERTO LOPEZ SOTOMAYOR
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mazzetti por su asesoría durante la concepción y ejecución de este proyecto.

Al Dr. Mario Cornejo, por su invaluable mentoría.

A la Sra. Vicky, y a los miembros del Servicio de Neurogenética por su apoyo durante la ejecución de este proyecto.

A Maria Luiza y Laura Jardim por acogerme en su laboratorio en Porto Alegre, Brasil para culminar la fase experimental de este estudio.

A mis padres, por su paciencia.

ABREVIATURAS

- AA-ICC: Concordancia absoluta-Correlación intraclase
- CE: Electroforesis capilar
- CIBN: Centro de Investigación Básica en Neurogenética
- DE: Desviación estándar
- dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato
- DUE: Elementos desenrolladores del ADN
- EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético
- GABA: Ácido gama-aminobutírico
- HCPA: Hospital de Clinicas de Porto Alegre
- hnRNP: Complejo ribonucleoproteico heteronuclear
- HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg
- INCN: Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
- LD: Desequilibrio de ligamiento
- mm: Milímetro
- mM: Milimolar
- ng: Nanogramo
- pb: Pares de bases
- PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- SCA: Ataxia espinocerebelosa
- SNP: Polimorfismo de un nucleótido
- STR: Repetición corta en tándem
- uL: Microlitro

- μM : Micromolar

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| MARCO TEÓRICO | 4 |
| Enfermedades por expansión de microsatélites inestables | 4 |
| Ataxias Espinocerebelosas | 5 |
| Ataxia Espinocerebelosa Tipo 10..... | 6 |
| Genética de SCA10 | 7 |
| Mecanismo de expansión del pentanucleótido ATTCT en SCA10 | 9 |
| Fisiopatología de SCA10 | 11 |
| OBJETIVOS | 13 |
| Objetivo general..... | 13 |
| Objetivo específico..... | 13 |
| Objetivo secundario | 13 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 14 |
| Diseño | 14 |
| Población:..... | 14 |
| Criterios de inclusión:..... | 14 |
| Criterios de exclusión:..... | 15 |
| Materiales | 15 |
| Descripción de los procedimientos..... | 18 |
| ASPECTOS ÉTICOS..... | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| DISCUSIÓN..... | 37 |
| CONCLUSIONES | 44 |
| RECOMENDACIONES..... | 45 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 46 |
| ANEXOS | 55 |
| ANEXO 1. Consentimiento informado | 56 |
| ANEXO 2: Constancia de aprobación ética..... | 62 |
| ANEXO 3: Compromiso de confidencialidad | 63 |
| ANEXO 4. Diagrama de flujo del estudio de distribución alélica..... | 64 |

RESUMEN

La ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómico dominante. Es causada por la expansión de un microsatélite (ATTCT)_n ubicado en el intrón 9 del gen *ATNX10* en el cromosoma 22q13.31. Los alelos normales tienen entre 10 y 32 repeticiones ATTCT; y los mutados, entre 280 y 4500 repeticiones. A excepción de dos familias asiáticas, todos los casos de SCA10 identificados tienen algún grado de ancestría nativa americana, lo que sugiere que la mutación causal de SCA10 surgió en América o en una población anterior a la divergencia entre las poblaciones del este de Asia y las proto-americanas.

Los alelos normales largos de genes asociados a otras ataxias espinocerebelosas serían más propensos a expandirse hasta tamaños patogénicos que los alelos normales pequeños. Por lo que se ha postulado que la alta frecuencia poblacional de alelos normales largos supondría un riesgo poblacional de padecer dicha enfermedad.

Este estudio analizó la distribución de las repeticiones ATTCT del gen *ATNX10* en una población quechua de Puno y la comparó con la distribución de otras poblaciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre estas poblaciones, lo que sugiere que la frecuencia poblacional de alelos normales largos no guarda relación con la elevada frecuencia de SCA10 en población con ancestría nativa americana. Asimismo, se compararon los genotipos inferidos mediante electroforesis capilar (CE) y en geles de poliacrilamida (PAGE), observándose una excelente concordancia entre ambas. Por lo tanto, PAGE sería una alternativa costo-efectiva adecuada para la genotipificación del microsatélite ATTCT del gen *ATNX10* en un rango no patológico.

ABSTRACT

Spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10) is a neurodegenerative disease with autosomal dominant inheritance caused by the abnormal expansion of a (ATTCT)_n microsatellite located in intron 9 of the *ATXN10* gene on chromosome 22q13.31 (Matsuura et al. 2000). Normal alleles range between 10 to 32 ATTCT repeats, and the mutated ones between 280 and 4500. 1 SCA10 cases have been identified almost exclusively in individuals with native American ancestry, with the exception of two Asian families, suggesting that the SCA10-causing mutation originated either in the Americas or in a population prior to the divergence of East Asians and proto-Amerindians.

Large normal alleles of other spinocerebellar ataxias-related genes seem to be prone to expanding to a pathogenic size. Thus, the high frequency of large normal alleles in SCA genes may predispose a population to the related disorder.

This study analyzed and compared the distribution of *ATXN10* ATTCT repeats in a healthy Amerindian (Quechua) population from Puno with that of other populations. No statistical significant difference were found among these, suggesting that the allele distribution in normal, healthy population has no major impact on the difference of SCA10 prevalence across populations. Genotypes inferred from capillary and polyacrylamide gel electrophoresis were also compared. There was an excellent agreement between CE and PAGE results, suggesting that PAGE is an appropriate cost-effective method for *ATXN10* genotyping within the non-pathogenic range.

INTRODUCCIÓN

Los microsatélites inestables son secuencias repetitivas cortas de número variable implicados en la patogénesis de numerosas enfermedades hereditarias que afectan al sistema nervioso (Batra, Charizanis y Swanson 2010; Spada y Taylor 2010). Cuando el tamaño de los microsatélites inestables se encuentra dentro de un rango de tamaño normal, se transmiten a la descendencia sin cambios de longitud. Sin embargo, cuando alcanzan cierto número umbral de repeticiones, se presentan expansiones intergeneracionales, usualmente acompañadas de anticipación génica; es decir, la enfermedad se manifiesta a una edad cada vez menor en cada generación (Matilla et al. 1993; Ranen et al. 1995).

Las ataxias espinocerebelosas (SCAs) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas autosómicas dominantes clínicamente heterogéneas causadas en su mayoría por la expansión de microsatélites inestables (Koeppen 2005). Los alelos normales largos de genes relacionados a SCAs serían propensos a expandirse hasta un tamaño patogénico, por lo que actuarían como fuentes de mutaciones *de novo*. La alta frecuencia de alelos normales largos en genes asociados a algunas SCAs puede predisponer a un mayor riesgo poblacional (Takano et al. 1998; Yanagisawa et al. 1996) y explica parcialmente la prevalencia variable de SCAs en diferentes regiones geográficas y grupos étnicos (Durr 2010; Ludger Schöls et al. 2004; Klockgether et al. 1998; Teive 2009).

La ataxia espinocerebelosa tipo 10 o SCA10 es una enfermedad neurodegenerativa de herencia autosómica dominante prácticamente ausente en individuos sin ancestría amerindia (Matsuura et al. 2002). Presenta variabilidad fenotípica según la región geográfica o grupo étnico de procedencia (Teive et al. 2011), y ha sido descrita, hasta el momento, en individuos de México (Grewal et al. 2002, p. 10; Rasmussen et al. 2001, p. 10), Brasil (Teive et al. 2010), Argentina (Gatto et al. 2007), Colombia (Roxburgh et al.

2013), Venezuela («Abstracts of The Movement Disorder Society's Thirteenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders» 2009), nativos de Estados Unidos (Bushara et al. 2013), Perú (Cornejo Olivas et al. 2013) y recientemente en China (Wang et al. 2015) y Japón (Naito et al. 2017).

La SCA10 es causada por la expansión (es decir, el incremento del número de copias) del pentanucleótido ATTCT en el intrón 9 del gen *ATXN10*, ubicado en el cromosoma 22q13.31 (Matsuura et al. 2000). Los alelos normales fluctúan entre 9 y 32 repeticiones; y los mutados, entre 280 y 4500 repeticiones (Wang et al. 2010; Matsuura et al. 2000; 2006). En el rango de 280 a 850 pentanucleótidos existiría penetrancia incompleta (Matsuura et al. 2006; Alonso et al. 2006, p. 10; Raskin et al. 2007, p. 10). Se ha propuesto que los alelos expandidos de *ATXN10* tendrían su origen en una mutación ancestral única que habría ocurrido en una población amerindia de México o Estados Unidos, desde donde se habría esparcido en dirección sur al resto de América durante las migraciones humanas (Bushara et al. 2013; Almeida et al. 2009). La presencia del alelo mutado en China y Japón se debería a migraciones posteriores que regresaron de América al este de Asia a través del estrecho de Bering. Alternativamente, el alelo mutado podría haber surgido en una población anterior a la divergencia entre los grupos asiáticos y proto-amerindios (Wang et al. 2015; Naito et al. 2017).

El Servicio de Neurogenética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas implementó, en el año 2007, el diagnóstico molecular de SCA3, considerada la ataxia más frecuente a nivel mundial. Sin embargo, se encontraron solo 2 familias, de un total de 53 familias peruanas, con este diagnóstico (Cornejo-Olivas M et al. 2011). Con apoyo de la *Rede Neurogenetica* del Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Río Grande del Sur, Brasil. <http://www6.ufrgs.br/redeneurogenetica/>) se diagnosticaron los 3 primeros casos de SCA10 en 3 familias de 20 analizadas (Cornejo Olivas et al. 2013). Posteriormente se

encontraron 27 casos de SCA10 en 21 familias peruanas (Bampi et al. 2017), sugiriendo que esta sería la ataxia dominante más frecuente en el Perú.

Se desconoce si existe alguna relación entre la alta frecuencia de SCA10 en el Perú y la frecuencia de alelos normales con un alto número de repeticiones, que supondría un factor de riesgo poblacional para otras enfermedades, como SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, DRPLA, enfermedad de Huntington, entre otras. (Takano et al. 1998; Squitieri et al. 1994). Teniendo en cuenta la distribución geográfica tan específica de SCA10 —prácticamente ausente fuera de América—, es importante estudiar el microsatélite ATTCT de SCA10 en poblaciones nativas americanas. El servicio de Neurogenética almacena en su DNAteca muestras de ADN de una comunidad quechua de Puno, que fueron colectadas para un estudio previo y cuentan con autorización para uso en estudios posteriores de enfermedades neurodegenerativas (Cornejo-Olivas et al. 2014). Estudiar la distribución alélica de *ATXN10* en una muestra de una población originaria de Puno permitiría detectar la posible existencia de alelos normales largos y ayudará a comprender el origen de esta enfermedad en el Perú.

MARCO TEÓRICO

Enfermedades por expansión de microsatélites inestables

Los microsatélites inestables son elementos de ADN formados por un número variable de unidades repetitivas en tándem (Batra, Charizanis y Swanson 2010). La unidad repetitiva puede tener entre 2 y 6 nucleótidos de longitud, siendo los trinucleótidos la unidad más frecuente. Cuando se encuentran en el rango “normal” de número repeticiones, suelen transmitirse a la descendencia sin variar su longitud. Sin embargo; los alelos que superan cierto número umbral de repeticiones (el cual varía entre diferentes SCAs), exhiben una marcada mutabilidad (Falush et al. 2001). A este fenómeno se le denomina mutación dinámica, y es responsable de un gran y creciente número de enfermedades hereditarias, la mayoría de las cuales afecta al sistema nervioso (Nelson, Orr y Warren 2013; Spada y Taylor 2010).

Las enfermedades por expansión de secuencias repetitivas están asociadas a un microsatélite inestable específico que se puede ubicar, dentro de un gen particular, tanto en una región codificante como en una no codificante (Batra, Charizanis y Swanson 2010). La expansión puede ejercer efectos tóxicos para la célula mediante diversos mecanismos; por ejemplo, puede alterar la estructura de la cromatina y la expresión génica (Tabolacci et al. 2008) o derivar en la síntesis de transcritos (White et al. 2010) o proteínas aberrantes que resultan tóxicas para la célula (Park et al. 2013; Monoi et al. 2000; Panov et al. 2002).

Una característica común a las enfermedades causadas por la expansión de microsatélites inestables es la anticipación génica: conforme la enfermedad se transmite a las generaciones siguientes, se manifiesta cada vez a edad más temprana y, usualmente, con fenotipo más severo (Matilla et al. 1993; Ranen et al. 1995). Este fenómeno suele

acompañarse de un incremento intergeneracional del número de repeticiones (Ludger Schöls et al. 2004).

Ataxias Espinocerebelosas

Las ataxias también conocidas como ataxias espinocerebelosas (SCAs), son un grupo heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas con herencia autosómico-dominante que poseen como característica común la alteración de la coordinación debido a degeneración progresiva del cerebelo y sus vías aferentes y eferentes; generando disartria y dificultad para la marcha (Teive et al. 2011). La SCA tipo 3 o enfermedad de Machado-Joseph-Thomas (MJD/SCA3) es la más frecuente a nivel mundial; sin embargo, la SCA10 más prevalente varía de una región a otra: SCA1 en Italia, SCA 2 en India y Cuba , SCA 7 en Suecia, Finlandia y Sudáfrica (Durr 2010; Ludger Schöls et al. 2004; Klockgether et al. 1998; Teive 2009). La mayoría de las SCAs son causadas por la expansión de secuencias repetitivas en microsatélites inestables y comparten las características generales de las enfermedades causadas por mutaciones dinámicas; es decir, anticipación génica y empobrecimiento del pronóstico clínico conforme la enfermedad es transmitida a las generaciones siguientes (Koeppen 2005).

La prevalencia de MJD/SCA3, SCA6 y Atrofia dentato-rubro-pallidoluysian (DRPLA; causada también por la expansión de tripletes repetitivos) es mayor en la población japonesa que en la caucásica; mientras que la frecuencia de SCA1 y SCA2, por el contrario, es mayor en población caucásica. Este comportamiento coincide con una mayor frecuencia de alelos grandes de MJD/SCA3, SCA6 y DRPLA en la población japonesa que en la caucásica, y se cumple lo contrario con los alelos grandes de SCA1 y SCA2 (Takano et al. 1998). Un estudio demostró que en la población japonesa los alelos mutados de DRPLA están exclusivamente asociados con un haplotipo particular (constituido por dos

polimorfismos) lo que sugiere un origen ancestral de esta enfermedad. En este estudio, los alelos intermedios y los normales grandes también estuvieron exclusivamente asociados al mismo haplotipo, el cual presenta menor frecuencia en poblaciones caucásicas (Yanagisawa et al. 1996). Asimismo, las poblaciones donde la enfermedad de Huntington alcanza mayor prevalencia presentan mayor frecuencia de alelos normales largos (Squitieri et al. 1994).

Ataxia Espinocerebelosa Tipo 10

La ataxia espinocerebelosa tipo 10 (SCA10) fue descrita por primera vez en 1998 en una familia con ascendencia mexicana (Grewal et al. 1998), y el gen mutante causante de la enfermedad fue mapeado en 1999 (Zu et al. 1999; Matsuura et al. 1999) e identificado en el año 2000 (Matsuura et al. 2000). Esta forma de ataxia hereditaria se produce por la expansión inestable de un pentanucleótido ATTCT en el intrón 9 del gen *ATXN10* en el cromosoma 22q13.31 y es una enfermedad casi exclusiva de individuos con ascendencia nativa americana. Se han descrito al menos 80 casos en 10 familias brasileñas (Teive et al. 2010), 40 casos en 6 familias mexicanas (Grewal et al. 2002, p. 10; Rasmussen et al. 2001, p. 10), 6 individuos afectados en una familia argentina (Gatto et al. 2007), 5 en una familia venezolana («Abstracts of The Movement Disorder Society's Thirteenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders» 2009), un caso en Colombia (Roxburgh et al. 2013), un caso en nativos Sioux de Estados Unidos (Bushara et al. 2013) y 27 casos en 21 familias en el Perú (Bampi et al. 2017). A pesar de grandes esfuerzos para identificar casos de esta enfermedad fuera de América (Matsuura et al. 2002), solo se han descrito 1 caso de un migrante peruano en Italia (Leonardi et al. 2014), tres individuos de una familia japonesa (Naito et al. 2017), y siete miembros de una familia China (Wang et al. 2015).

El cuadro clínico de SCA10 se caracteriza por ataxia cerebelosa lentamente progresiva de edades de inicio que varían entre los 12 y 48 años. Según la clasificación de A. Harding, la SCA10 es considerada una ataxia autosómica dominante de tipo 3, que corresponde a un síndrome puramente cerebelar (Harding 1988); aunque, puede acompañarse de disartria, disfagia (Matsuura y Ashizawa 1993), nistagmus y dismetría ocular (Teive et al. 2011) y crisis epilépticas. Se han descrito convulsiones recurrentes con frecuencias variables entre las diferentes familias, la incidencia en pacientes de origen mexicano es del 60% (24 de 40 pacientes) (Grewal et al. 2002, p. 10; Rasmussen et al. 2001, p. 10); mientras que en Brasil es tan solo 3.75% (3 de 80) (Teive et al. 2011; Matsuura y Ashizawa 1993). Se han descrito, también, alteraciones cognitivas discretas (CI ~ 70), polineuropatía y piramidalismo como hiperreflexia, espasticidad de miembros inferiores y Babinski (Rasmussen et al. 2001, p. 10). Estudios de neuroimágenes por resonancia magnética nuclear han demostrado la presencia de atrofia cerebelosa progresiva con preservación de la corteza y tronco cerebral; asimismo, la electroencefalografía interictal muestra signos de disfunción cortical con o sin descargas epileptiformes focales (Matsuura y Ashizawa 1993).

Genética de SCA10

La SCA10 es producida por una mutación dinámica en el pentanucleótido repetitivo ATTCT en el intrón 9 del gen *ATXN10* en el cromosoma 22q13.31 (Matsuura et al. 2000). Un estudio de 302 individuos sanos estableció que el rango normal de repeticiones de ATTCT fluctuaba entre 10 y 22 pentanucleótidos y presentaba distribución unimodal (Matsuura et al. 2000). Posteriormente, se encontraron individuos sanos con 9 a 32 repeticiones (Matsuura et al. 2006; Wang et al. 2008).

La SCA10 muestra penetrancia incompleta entre 280 y 850 repeticiones (Matsuura et al. 2000). Se ha descrito un individuo con un alelo de 280 repeticiones que manifestó una forma

juvenil de la enfermedad. Este alelo fue heredado del padre, quien era asintomático (Matsuura et al. 2006). Asimismo, se han descrito pacientes afectados con 400; 750; 760 pentanucleótidos (Alonso et al. 2006); e individuos asintomáticos con 850 repeticiones (Raskin et al. 2007).

Un estudio —basado en 4 SNPs y 2 microsatélites en una región de ~1.7Mb alrededor de ATTCT— en población mexicana y brasilera encontró un haplotipo (CGGC) conservado en los cromosomas portadores de la mutación (Almeida et al. 2009). Sin embargo, la asociación con el haplotipo completo —incluyendo los 2 STR: 8CGGC1— solo fue significativa en la población brasilera, encontrándose dos haplotipos (8CGGC5 y 6CGGC5) presuntamente derivados del haplotipo ancestral. Sobre la base de estos resultados, los autores propusieron que la expansión del microsatélite inestable de *ATXN10* habría ocurrido en una población amerindia mexicana y que el alelo mutado ancestral se habría distribuido de norte a sur por México, Brasil y, probablemente, otras poblaciones amerindias de América latina durante el poblamiento de América. Esta hipótesis explicaría la limitada distribución geográfica de los casos de SCA10 (Almeida et al. 2009). La descripción posterior de un caso de SCA10, portador también del haplotipo CGGC, en una tribu nativa de Estados Unidos deja abierta la posibilidad de que la SCA10 se haya originado en Estados Unidos o incluso en el Estrecho de Bering (Bushara et al. 2013). Finalmente, el hallazgo reciente de una familia japonesa y una china con miembros afectados por SCA10 sugiere que la mutación habría llegado al este de Asia con poblaciones humanas que retornaron de América a través del Estrecho de Bering, o que esta surgió en una población anterior a la divergencia entre las poblaciones asiática y proto-amerindia (Wang et al. 2015; Naito et al. 2017).

Almeida y col. sugieren que la tasa de mutación de este microsatélite es muy baja, y que la conversión génica, favorecida por la presencia, en grandes proporciones, de secuencias

Alu y LINE en el intrón 9 de *ATXN10*, habría contribuido a la expansión ancestral del pentanucleótido ATTCT de *ATXN10* (Almeida et al. 2009). Asimismo, el hipotético origen ancestral único de todas las mutaciones de SCA10 sugiere que las expansiones en el rango de penetrancia incompleta (280-850) no serían “premutaciones”, sino alelos producidos por la contracción de alelos de mayor tamaño. Cabe destacar, sin embargo, que en ninguna de las poblaciones estudiadas se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el haplotipo CGGC y la mutación de *ATXN10*, presumiblemente debido a que la frecuencia poblacional de este haplotipo es alta no solo en pacientes con SCA10, sino también en la población general (Almeida et al. 2009); por lo que el bajo tamaño muestral utilizado no habría permitido alcanzar suficiente potencia estadística para detectar diferencias entre la frecuencia de este haplotipo en pacientes y controles sanos.

A pesar de la elevada frecuencia de SCA10 en población mexicana, se ha descrito que la distribución de alelos normales es semejante y aproximadamente simétrica en poblaciones sanas de origen mexicano (n=127), japonés (n=50), europeo (n=125) (Matsuura et al. 2000), Finlandés (n=502) (Juvonen et al. 2005) y chipriota (n = 58) (Votsi et al. 2012). Estos hallazgos no concuerdan con la hipótesis (Takano et al. 1998) de que la alta prevalencia de algunas SCAs en ciertas poblaciones es parcialmente atribuible a la frecuencia elevada de alelos normales largos; pero sí es compatible con el comportamiento esperado según la hipótesis de un único origen ancestral.

Mecanismo de expansión del pentanucleótido ATTCT en SCA10

Los elementos DUE (*DNA unwinding elements*) participan en el inicio de la replicación del ADN. En bacterias, virus y levaduras, es común que la replicación inicie en sitios ricos en adenina (A) y timina (T), que tienden a desaparecer debido a la débil unión entre estas

bases nitrogenadas. Estos elementos, denominados DUE, aunque escasos, también están presentes en el genoma humano (Kemp et al. 2007).

El microsatélite ATTCT de *ATXN10* puede actuar como un DUE. A diferencia de las secuencias repetitivas de otros microsatélites inestables, la expansión ATTCT de *ATXN10* no forma estructuras secundarias ni deslizamientos de ADN. Las regiones de ADN que contienen repeticiones de este pentanucleótido tienden a desaparecerse en condiciones fisiológicas debido al alto contenido de A y T, induciendo la formación de horquillas de replicación (Potaman et al. 2003). La función iniciadora de replicación del elemento DUE del gen c-myc puede ser reemplazada por secuencias repetitivas (ATTCT)₂₇ o (ATTCT)₄₈, pero no por (ATTCT)₈ ni (ATTCT)₁₃. Asimismo, cuando esta secuencia repetitiva fue clonada ectópicamente en un contexto que favorecía la replicación (dentro del DUE de c-myc) este microsatélite mostró inestabilidad genética proporcional al número de repeticiones insertadas (Liu et al. 2007).

Estos y otros estudios posteriores han mostrado que la inestabilidad genética del microsatélite ATTCT de *ATXN10* es un fenómeno dependiente de la replicación. Las expansiones ocurren principalmente mediante un *intercambio de hebra molde*; fenómeno en el cual la polimerasa que sintetiza la hebra guía pasa a usar como molde los fragmentos de Okazaki de la hebra rezagada, los cuales son complementarios a la hebra guía naciente (Cherng et al. 2011). El intercambio de hebra molde estaría favorecido por la disociación parcial espontánea de los fragmentos de Okazaki con elevado número de ATTCT y explicarían el tamaño masivo de las expansiones en SCA10, ya que el número de repeticiones incrementado en cada evento correspondería aproximadamente al tamaño de un fragmento de Okazaki (~150-200 pb) (Cherng et al. 2011). Asimismo, en un modelo de estudio similar que utiliza el DUE (GAA)_n, los fragmentos repetitivos menores a la longitud promedio de un fragmento de Okazaki no sufren expansiones masivas, lo que supondría

un tamaño umbral para la ocurrencia de estas expansiones (Shah et al. 2012). Por otro lado, las contracciones de ATTCT en *ATXN10* ocurren por un mecanismo favorecido por la inestabilidad de la horquilla de replicación pero distinto al intercambio de hebra molde; posiblemente al omitir un fragmento sobresaliente durante la replicación (Shah et al. 2012).

Se piensa que tanto el mecanismo de expansión como el de contracción descritos contribuyen a la ocurrencia de las mutaciones dinámicas observadas en pacientes con SCA10. Sin embargo, la tasa de expansión y contracción de este microsatélite es mucho menor a la de otros microsatélites que sí forman estructuras de ADN secundarias, tales como (GAA)_n y (CAG)_n (Cherng et al. 2011). Asimismo, es posible que estos mecanismos de inestabilidad genética solo se manifiesten en alelos ya expandidos (cuya longitud es superior a la de un fragmento de Okazaki) en concordancia con la hipótesis de un único origen ancestral común de SCA10 y la ausencia de esta enfermedad en poblaciones no amerindias. Como se describió anteriormente, es probable que la mutación ancestral se haya producido por conversión génica, favorecida por la presencia de elementos ALU y Line, que representan el 32% de la longitud total del intrón 9 de *ATXN10* (Almeida et al. 2009).

Fisiopatología de SCA10

Se han descartado la pérdida de función y la haploinsuficiencia de *ATXN10* como mecanismo patogénico responsable del fenotipo de SCA10. El nivel de expresión de los alelos expandidos de *ATXN10* es semejante al de los alelos normales, y su expansión no altera el patrón de *splicing*; además, modelos murinos heterocigotos (*Sca10*^{+/-null}) no reproducen el fenotipo de SCA10 (Wakamiya et al. 2006, p. 10). Por otro lado, en una familia se describió la presencia de una translocación balanceada t(2;22)(p25.3;q13.31) que

produjo la relocalización de los exones 3-10 de *ATXN10* al cromosoma 2. A pesar de la ruptura de *ATXN10*, ningún miembro de la familia presentó SCA10 (Keren et al. 2009).

Existe evidencia contundente de que el ARN expandido tendría un efecto tóxico en la célula. Mediante la secuencia repetitiva AUUCU, el ARNm de *ATXN10* interactúa con el dominio (KH) presente en numerosas proteínas, entre ellas hnRNP-K, que al unirse y ser secuestrada por el mRNA expandido de *ATXN10* –mediante la interacción AUUCU-KH– induce la translocación de PKC δ a la mitocondria, lo que finalmente deriva en muerte celular por apoptosis (White et al. 2012; 2010). Además, el transcrito expandido de *ATXN10* también secuestra a través del dominio KH a la proteína Nova, un factor necesario para el *splicing* correcto de muchas proteínas, entre las que se encuentran subunidades de los receptores de los neurotransmisores GABA y glicina (*GABAAR γ 2* y *GlyR α 2*, respectivamente). Se ha demostrado que la alteración del *splicing* alternativo de *GABAAR γ 2* altera las transmisiones inhibitorias en las células de Purkinje del cerebelo (Jung Gook Lim 2012). Estos estudios demuestran que la patogénesis de SCA10 estaría principalmente mediada por un mecanismo de ganancia de función tóxica por el ARNm expandido de *ATXN10*.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Describir la distribución de los alelos normales de *ATXN10* en una población quechua de Puno.

Objetivo específico

- Estandarizar la genotipificación del alelo normal del gen *ATXN10*.
- Describir la frecuencia de alelos normales altos en una muestra de la población Quechua de Puno.
- Comparar la distribución de alelos en una muestra quechua de Puno con otras poblaciones.

Objetivo secundario

- Comparar los resultados obtenidos mediante electroforesis en poliacrilamida y los obtenidos por electroforesis capilar.

MATERIALES Y METODOS

Diseño: Estudio observacional descriptivo tipo transversal para describir distribución alélica.

Población:

Se seleccionaron 49 muestras de individuos de una población Quechua de Puno.

- Se seleccionaron todas las muestras disponibles de un estudio anterior que contaban con consentimiento informado para participar en futuros estudios genéticos (Anexo 1).
- El poder estadístico se calculó con el software Minsage, el cual se basa en una estimación de la probabilidad, dada la presencia o ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg, de capturar un alelo con una frecuencia poblacional elegida (46). Para este tamaño muestral, se estimó que la probabilidad de capturar alelos normales largos (≥ 17 repeticiones, frecuencia poblacional = 7.1% (Matsuura et al. 2006)) fue de 97.4; y la probabilidad de capturar un alelo de 18 repeticiones (frecuencia poblacional = 2% (Matsuura et al. 2006)) fue de 63% en ausencia de equilibrio de Hardy Weinberg. Se incluyó el alelo de 18 repeticiones en este análisis debido a que es el alelo menos frecuente con una frecuencia mayor a 1%.

Criterios de inclusión:

- Muestras de Individuos no emparentados entre sí mayores de 18 años nacidos en la región Puno.
- Autodenominados como de origen Quechua
- Con consentimiento informado autorizando uso de la muestra en estudios posteriores.
- Padres y abuelos nacidos en la región Puno.

Criterios de exclusión:

- Muestras de individuos con información demográfica incompleta.
- Individuos portadores o con antecedente de enfermedad neurodegenerativa hereditaria.

Materiales**Reactivos**

- Reactivos Tris-HCl
- Nitrato de plata
- Cloruro de magnesio
- Hidróxido de sodio
- Cloruro de sodio
- Formaldehído
- EDTA
- Acrilamida
- Bisacrilamida
- Etanol absoluto
- Agua bidestilada
- Ácido acético
- Polimerasa

Materiales de laboratorio

- Probetas
- Microtubo (1,5ml)
- Vasos precipitado
- Microtubo (0,2ml)

- Fiolas
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Pipetas
- Respirador
- Gorro de laboratorio
- Gradillas
- Tubos al vacío
- Tips (10µl)
- Algodón
- Tips (100µl)
- Papel aluminio
- Tips (1000µl)
- Tubos EDTA

Equipos

- Termociclador GeneAmp 9700
- Espectrofotómetro de microplaca EPOCH
- Espectrofotómetro NanoDrop
- ABI3130 XL
- Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000uL
- Cabina de PCR
- Fuente de poder
- Cámara electroforética
- Balanza analítica

- Vórtex
- Agitador magnético

Descripción de los procedimientos

Obtención de las muestras

Las muestras fueron obtenidas de la ADNteca del Centro de Investigación Básica en Neurogenética. Estas fueron colectadas para el estudio “Análisis del gen *LRRK2* en la enfermedad de Parkinson en población peruana”, aprobado por el comité de ética institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (constancia 205-21-13) financiado por el *Latin American Research Consortium on the Genetics of Parkinson's Disease*, y cuentan con consentimiento para participar en estudios genéticos posteriores (Anexo 2).

El análisis molecular se realizó en dos lugares: En el Centro de Investigación Básica en Neurogenética (CIBN) mediante electroforesis en poliacrilamida (PAGE), y en el *Serviço de Genética Médica* del *Hospital de Clinicas de Porto Alegre* (HCPA), Brasil, mediante electroforesis capilar con los propósitos de confirmar los resultados y evaluar el desempeño del método basado en PAGE, habitualmente empleado en el CIBN.

Análisis molecular en el Centro de Investigación básica en Neurogenética

Cuantificación y dilución de ADN

Se obtuvieron alícuotas de 7uL de ADN de cada muestra stock almacenada en la ADNteca. Las muestras stock de ADN de la ADNteca son obtenidas mediante extracción por el método *salting out* a partir de 10mL de sangre periférica. El ADN stock se encuentra almacenado a -70°C. Se utilizaron 2 uL de cada muestra stock para medir la concentración inicial y el índice A260/A280 en un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH *microplate spectrophotometer*). Los 5uL de ADN restante fueron diluidos con agua bidestilada en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 10ng/uL.

Amplificación por PCR

El ADN fue amplificado por PCR convencional utilizando la enzima AmpliTaq Gold Polimerasa utilizando cebadores descritos en la literatura científica (Matsuura et al. 2000):

- Cebador *forward* attct-L: 5'–AGAAAACAGATGGCAGAATGA–3'
- Cebador *reverse* attct-R: 5'–GCCTGGGCAACATAGAGAGA–3'

Se empleó las condiciones de amplificación previamente descritas para este par de cebadores (Matsuura et al. 2000). Las condiciones de ciclaje se muestran en la Tabla 1. El volumen final de 10uL; la concentración de los reactivos se muestra en la Tabla 2.

Tabla 1. Ciclaje de la reacción de amplificación del microsatélite de *ATXN10*

| Desnaturalización inicial | | 95°C por 15 minutos | |
|---------------------------|-------------------|---------------------|------------|
| | | Temperatura (°C) | Tiempo (s) |
| 30 ciclos | Desnaturalización | 94 | 30 |
| | Hibridación | 54 | 30 |
| | Extensión | 72 | 45 |
| Extensión final | | 72°C por 7 minutos | |

Tabla 2. Preparación del mix de amplificación del microsatélite de *ATXN10*

| Reactivo | Volumen (uL) | Concentración final |
|----------------------------|-----------------|---------------------|
| Buffer Gold Amplitaq 1X | 1 | 0.1X |
| dNTPs 10mM | 0.8 | 0.8mM |
| Primer Forward (20uM) | 0.4 | 0.8uM |
| Primer Reverse (20uM) | 0.4 | 0.8uM |
| MgCl ₂ 25mM | 0.8 | 2mM |
| Enzima Gold Amplitaq 5U/uL | 0.08 | 0.04U/uL |
| H ₂ O | 5.52 | - |
| ADN 10ng/uL | 1 | 1ng/uL |

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los productos de PCR fueron genotipificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 6%, utilizando una proporción de acrilamida: bis-acrilamida de 1:20. El buffer empleado consistió en 1.8mL de Tris Borato EDTA (TBE) 10X, 140uL de per sulfato de amonio (APS) 10% y 14uL de N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina (TEMED).

Los geles fueron revelados mediante el método de tinción con nitrato de plata. Primero, los geles fueron sumergidos durante 5 minutos en la solución fijadora formada por 750mL de ácido acético, 5mL de etanol, 150mL de agua bidestilada, y luego enjuagados con agua bidestilada. Posteriormente, los geles fueron sumergidos por 1 a 2 minutos en una solución de nitrato de plata al 0.2%, y enjuagados nuevamente con agua bidestilada. Finalmente, los geles fueron sumergidos en solución de revelado formada por 3g de hidróxido de sodio, 450uL de formaldehído y 150mL de agua.

El número de repeticiones se estimó mediante una regresión lineal simple. Seis controles normales de tamaño previamente determinado por electroforesis capilar, donados a través de la *Rede Neurogenética* de Brasil, fueron utilizados para construir la siguiente curva estándar que permitió estimar el tamaño de los alelos de las muestras problema (Shapiro, Viñuela y V. Maizel Jr. 1967):

$$Y = a + \beta X$$

Donde:

$Y = \log_2(\text{Peso molecular en pares de bases})$

$\beta = \text{Coeficiente de regresión}$

$X = \text{Distancia migrada desde el punto de siembra de la muestra (mm)}$

Se utilizaron aquellos geles cuyo coeficiente de determinación (r^2) fue mayor a 0.99.

Análisis molecular en el *Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil*

El análisis en el Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) fue realizado por el autor de este trabajo. Se transportaron 50uL de ADN diluido en agua bidestilada a una concentración final de 20ng/uL. El ADN restante permaneció almacenado en la ADNteca del CIBN.

La concentración de ADN fue nuevamente cuantificada al llegar al HCPA utilizando un espectrofotómetro NanoDrop para confirmar que la concentración de las muestras fue la deseada.

La amplificación se realizó mediante el método estandarizado en el *Laboratório de Identificação Genética* del *Serviço de Genética Médica* del *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (Alonso et al. 2006, p. 10) el cual consiste en el mismo método de amplificación que el empleado por el CIBN, originalmente diseñado por Matsuura y col. (Matsuura et al. 2000, p. 10). Los cebadores para la amplificación de *ATXN10* fueron marcados con 6-FAM (6-Carboxifluoresceína).

El número de repeticiones fue determinado mediante electroforesis capilar en un sistema ABI3130XL en condiciones desnaturalizantes. El volumen final de reacción fue de 10uL, compuesto por 9.35uL de buffer formamida Hi-Di™, 0.15uL del marcador estándar GeneScan™-500 LIZ, y 0.5uL del producto de PCR. Los tubos de reacción fueron calentados por 5 minutos a 95°C y luego enfriados en una placa fría por 5 minutos. El tiempo de inyección fue de 22 segundos, y el tiempo de corrida de 40 minutos a 3KV en capilares de 50cm.

Análisis de concordancia entre resultados de electroforesis capilar y electroforesis en geles de poliacrilamida

La concordancia absoluta entre las mediciones por CE y PAGE fue calculada mediante una correlación intraclass (ICC) de dos vías con efectos mixtos, según el modelo especificado a continuación (Koo y Li 2016):

$$y_{ij} = \mu + a_i + b_j + (ab)_{ij} + e_{ij}$$

Donde “i” es el índice que especifica cada método usado (PAGE, CE); “j” es el índice que hace referencia a cada una de las 49 muestras. Además:

- μ = Media de todas las mediciones
- a_i = Desviación promedio —con respecto a la media total— de las mediciones del método “i”.
- b_j = Desviación promedio —con respecto a la media total— de las mediciones de la muestra método “j”.
- $(ab)_{ij}$ = Interacción entre los efectos del método “i” y la muestra “j”.
- e_{ij} = Error aleatorio, se asume que sigue una distribución normal con media cero y varianza constante ($e_{ij} \sim N(0, \sigma^2_{cte})$)

Se considera que los efectos del método “i” son constantes (a_i), y que los efectos de la muestra “j” (b_j) son aleatorios; por lo tanto, el modelo detallado es un modelo mixto (posee efectos fijos y aleatorios) (Koo y Li 2016).

ASPECTOS ÉTICOS

- Todas las muestras tuvieron consentimiento informado para uso en estudios genéticos posteriores.
- Se incluyeron muestras de ADN previamente decodificadas, sin información de identificación personal. Las muestras de ADN y los datos relevantes para la investigación estuvieron codificados con una numeración arábica correlativa que se utiliza para el registro de muestras de ADN del servicio.
- Es rutina del Servicio que todo investigador que participa de las actividades científicas firme un compromiso de confidencialidad que lo obliga a la reserva de los datos a los que accede, desde el inicio de su trabajo y hasta el término del mismo o en adelante según sea el caso (Anexo 3).
- No se encontró alelo alguno en rango patológico, por lo que no hubo necesidad de contactar a los participantes del estudio.

RESULTADOS

1. Estandarización de la genotipificación del alelo normal del gen *ATXN10* por PCR convencional.

El microsatélite inestable del gen *ATXN10* fue amplificado por PCR convencional y genotipificado mediante electroforesis en poliacrilamida con tinción por nitrato de plata. La fig. 1 ejemplifica los resultados obtenidos tras la electroforesis en poliacrilamida.

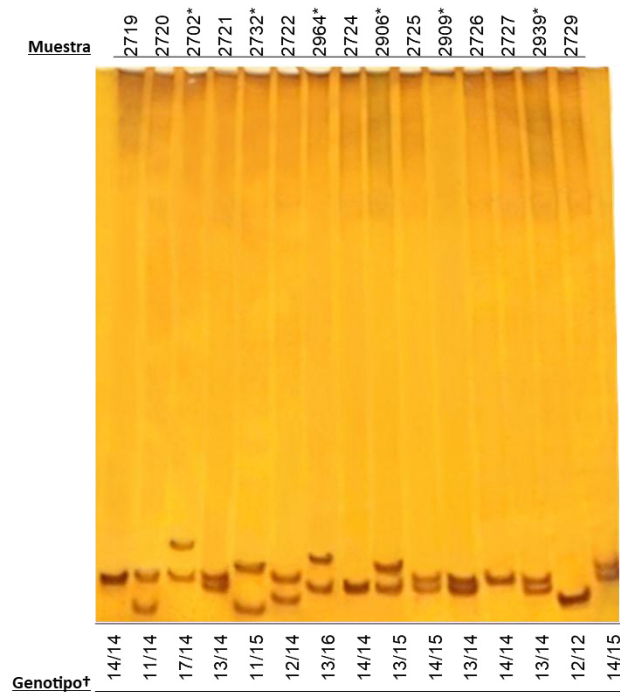


Figura 1. Resultado de una electroforesis en gel de poliacrilamida. Se incluyeron 6 controles con genotipo conocido (marcados con un asterisco) y 9 muestras problema. Se muestra tanto el genotipo de los controles como el de las muestras problema. (*): Muestras de genotipo conocido usadas como marcadores de peso molecular. (†): Se muestra el genotipo de las muestras problema inferido a partir del modelo lineal explicado más adelante.

Se construyó un modelo lineal utilizando el logaritmo del peso molecular y la distancia migrada por las muestras controles para construir un modelo lineal (tabla 3 y fig. 2). Existe una relación inversamente proporcional entre el logaritmo del peso molecular (en pares de bases) y la distancia migrada.

Las muestras también fueron genotipificadas mediante electroforesis capilar (fig. 3). Este procedimiento, también infiere el tamaño de los fragmentos de ADN comparando la distancia migrada por las muestras problemas con la de un marcador de peso molecular, conformado en este caso por 16 fragmentos de ADN de tamaño conocido (marcador GeneScan™ 500 LIZ® S).

Tabla 3. Datos usados para construcción de un modelo de regresión lineal.

| Muestra | Peso | | distancia (mm) | log ₂ (pb) |
|---------|-------------------|------|-------------------|-----------------------|
| | molecular (pb) | | | |
| 2702 | 214 | 74.5 | 7.7415 | |
| | 199 | 79.5 | 7.6366 | |
| 2732 | 184 | 84.8 | 7.5236 | |
| | 204 | 78 | 7.6724 | |
| 2964 | 192.5 | 81.2 | 7.5887 | |
| | 207 | 76.5 | 7.6935 | |
| 2906 | 193.5 | 81.5 | 7.5962 | |
| | 203.5 | 78 | 7.6689 | |
| 2909 | 193.5 | 82 | 7.5962 | |
| | 198 | 80 | 7.6294 | |
| 2939 | 188.5 | 83 | 7.5584 | |

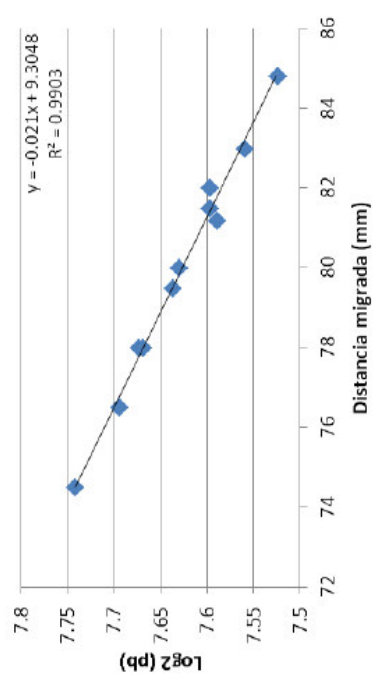


Figura 2. Resultado de la regresión lineal. Se muestra el resultado de una regresión lineal que ejemplifica el método utilizado para la estimación del número de repeticiones de La regresión. Se incluyeron 6 controles (7 alelos) en la construcción del y 9 muestras problema.

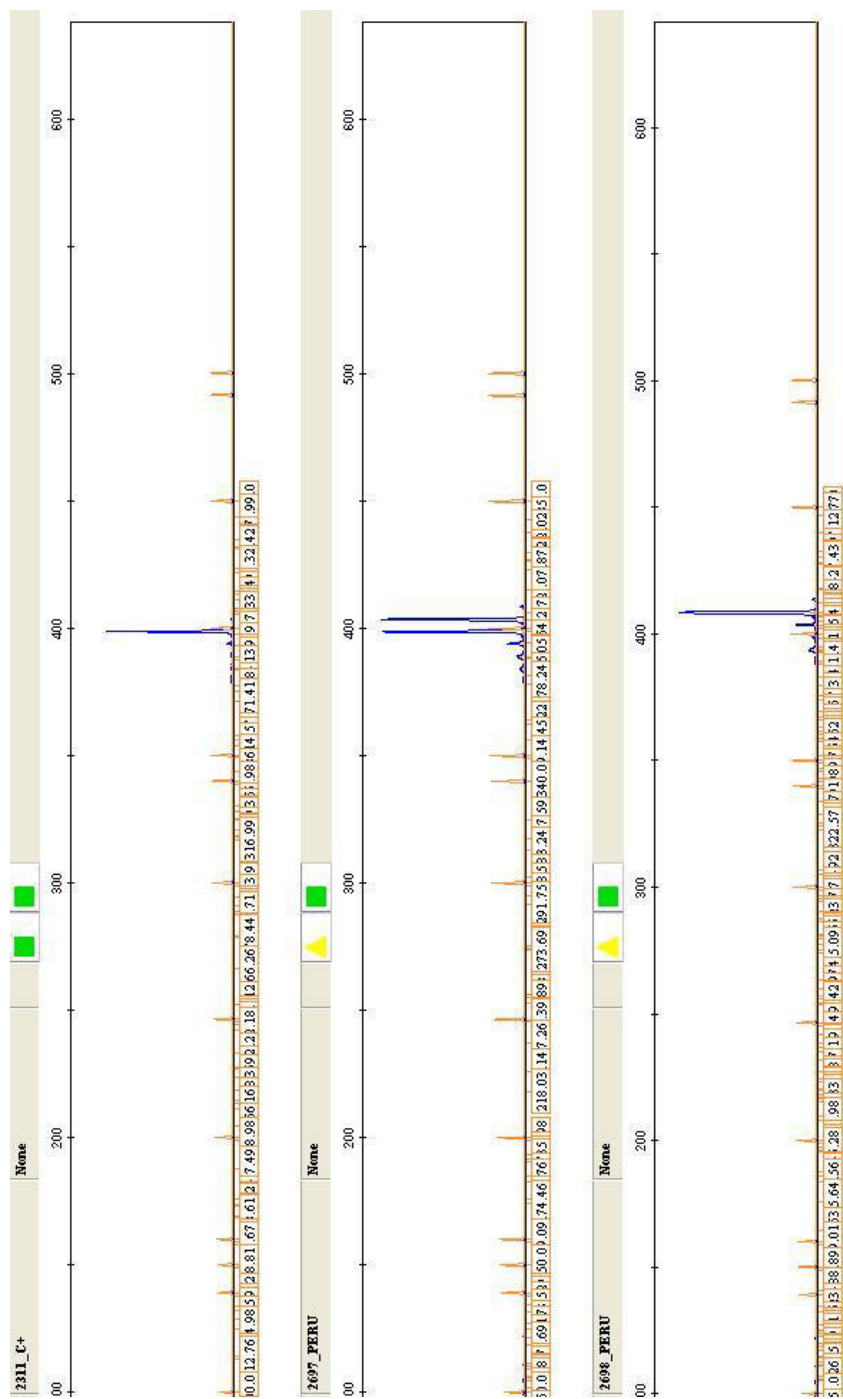


Figura 3. Resultados de electroforesis capilar. El panel superior se visualiza un control positivo; en el panel del medio, una muestra problema heterocigota; y en el inferior, una muestra problema homocigota. Los picos azules corresponden a los productos de PCR, detectables por el tinte fluorescente con el que fueron marcados (6-FAM). Los picos naranjas corresponden a los fragmentos de ADN que conforman el marcador estándar GeneScan™ 500 LIZ, con tamaños de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 nucleótidos.

Tabla 3. Estimación del número de repeticiones ATTCT de 9 muestras problema usando el modelo lineal mostrado en la figura 2.

| Muestra | distancia (mm) | log(pb) | pb | Nº Repeticiones |
|---------|-------------------|---------|-----|-----------------|
| 2719 | 81 | 7.6038 | 195 | 14 |
| | 81 | 7.6038 | 195 | 14 |
| 2720 | 85 | 7.5198 | 184 | 11 |
| | 80 | 7.6248 | 197 | 14 |
| 2721 | 81.5 | 7.5933 | 193 | 13 |
| | 79.5 | 7.6353 | 199 | 14 |
| 2722 | 82.9 | 7.5639 | 189 | 12 |
| | 79.5 | 7.6353 | 199 | 14 |
| 2724 | 81 | 7.6038 | 195 | 14 |
| | 81 | 7.6038 | 195 | 14 |
| 2725 | 79 | 7.6458 | 200 | 15 |
| | 81 | 7.6038 | 195 | 14 |
| 2726 | 80 | 7.6248 | 197 | 14 |
| | 80 | 7.6248 | 197 | 14 |
| 2727 | 82 | 7.5828 | 192 | 13 |
| | 80 | 7.6248 | 197 | 14 |
| 2729 | 80 | 7.6248 | 197 | 14 |
| | 78 | 7.6668 | 203 | 15 |

2. Comparación de resultados entre PAGE y Electroforesis capilar:

Los resultados obtenidos mediante electroforesis capilar (CE) y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) fueron muy semejantes (fig. 4 y tabla 5). Se empleó STATA v.13 para calcular la concordancia absoluta mediante la correlación intraclase (AA-ICC: *Absolute Agreement-Intraclass correlation*) basada en un modelo mixto (efectos fijos y aleatorios), que consideró que el método de genotipificación tiene un efecto fijo sobre la medición y que los alelos son aleatorios. El coeficiente AA-ICC individual fue 0.929 (IC95[0.885-0.955]), lo que indica que la confiabilidad es excelente o muy buena (Koo y Li 2016). La correlación de Pearson fue de 0.935 (fig. 4). La máxima diferencia encontrada fue de una repetición. Se encontraron discrepancias en 20 alelos (20.4%), de los cuales 17 presentaron una sobreestimación de una repetición; y los 3 restantes, una subestimación de una repetición (tabla 5).

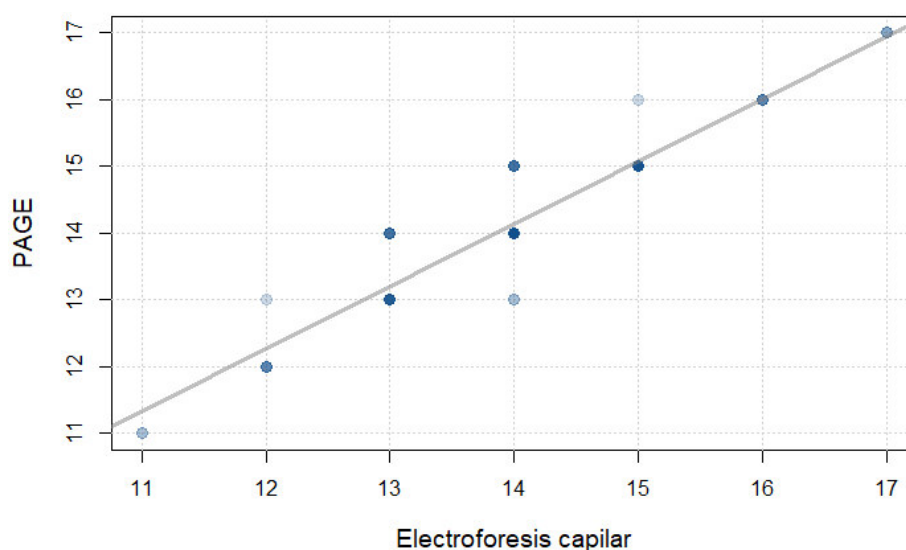


Figura 4. Relación entre el tamaño de los alelos estimado mediante electroforesis capilar y mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). La intensidad del color azul representa cuántos puntos se superponen en cada posición.

Tabla 5. Comparación entre los resultados obtenidos por electroforesis capilar y los obtenidos por geles de poliacrilamida.

| Muestra | Electroforesis capilar (CE) | | | | PAGE 6% | | Diferencia (PAGE-CE) | |
|---------|-----------------------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| | alelo | Alelo | A. | A. | A. | A. | A. | A. |
| | mayor (pb) | menor (pb) | menor (rep.) | mayor (rep.) | menor (rep.) | mayor (rep.) | mayor (rep.) | menor (rep.) |
| 2697 | 398.84 | 403.59 | 13 | 14 | 13 | 15 | 0 | 1 |
| 2698 | 408.29 | 408.29 | 15 | 15 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| 2700 | 398.61 | 398.61 | 13 | 13 | 14 | 14 | 1 | 1 |
| 2702 | 403.61 | 418.53 | 14 | 17 | 14 | 17 | 0 | 0 |
| 2703 | 393.95 | 403.7 | 12 | 14 | 13 | 15 | 1 | 1 |
| 2704 | 403.39 | 403.39 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2705 | 398.69 | 398.69 | 13 | 13 | 13 | 13 | 0 | 0 |
| 2706 | 403.37 | 403.37 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2707 | 403.49 | 403.49 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2708 | 398.77 | 398.77 | 13 | 13 | 14 | 14 | 1 | 1 |
| 2709 | 403.65 | 403.65 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2710 | 398.85 | 398.85 | 13 | 13 | 13 | 13 | 0 | 0 |
| 2711 | 393.91 | 403.6 | 12 | 14 | 12 | 14 | 0 | 0 |
| 2712 | 403.64 | 403.64 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2713 | 398.77 | 403.67 | 13 | 14 | 13 | 14 | 0 | 0 |
| 2714 | 403.66 | 408.52 | 14 | 15 | 14 | 15 | 0 | 0 |
| 2715 | 408.51 | 408.51 | 15 | 15 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| 2716 | 403.68 | 413.49 | 14 | 16 | 15 | 16 | 1 | 0 |
| 2717 | 403.76 | 403.76 | 14 | 14 | 15 | 15 | 1 | 1 |
| 2718 | 408.51 | 393.6 | 15 | 12 | 15 | 12 | 0 | 0 |
| 2719 | 403.59 | 403.59 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2720 | 389.18 | 403.6 | 11 | 14 | 11 | 14 | 0 | 0 |
| 2721 | 398.78 | 403.63 | 13 | 14 | 13 | 14 | 0 | 0 |
| 2722 | 393.93 | 403.64 | 12 | 14 | 12 | 14 | 0 | 0 |
| 2723 | 403.55 | 408.52 | 14 | 15 | 14 | 15 | 0 | 0 |
| 2724 | 398.63 | 398.63 | 13 | 13 | 14 | 14 | 1 | 1 |
| 2725 | 398.85 | 403.57 | 13 | 14 | 14 | 15 | 1 | 1 |

Tabla 5. Comparación entre los resultados obtenidos por electroforesis capilar y los obtenidos por geles de poliacrilamida.

| | | | | | | | | |
|------|--------|--------|----|----|----|----|----|----|
| 2726 | 403.65 | 403.65 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2727 | 398.7 | 403.56 | 13 | 14 | 13 | 14 | 0 | 0 |
| 2728 | 413.16 | 403.65 | 16 | 14 | 16 | 14 | 0 | 0 |
| 2729 | 403.69 | 408.68 | 14 | 15 | 14 | 15 | 0 | 0 |
| 2730 | 418.54 | 418.54 | 17 | 17 | 17 | 17 | 0 | 0 |
| 2731 | 403.44 | 403.44 | 14 | 14 | 13 | 13 | -1 | -1 |
| 2732 | 389.24 | 408.55 | 11 | 15 | 11 | 15 | 0 | 0 |
| 2733 | 398.76 | 403.64 | 13 | 14 | 13 | 14 | 0 | 0 |
| 2955 | 403.69 | 403.69 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2956 | 403.62 | 408.54 | 14 | 15 | 14 | 15 | 0 | 0 |
| 2957 | 408.51 | 408.51 | 15 | 15 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| 2958 | 393.68 | 393.68 | 12 | 12 | 12 | 12 | 0 | 0 |
| 2959 | 413.45 | 413.45 | 16 | 16 | 16 | 16 | 0 | 0 |
| 2960 | 403.65 | 408.58 | 14 | 15 | 15 | 16 | 1 | 1 |
| 2961 | 408.58 | 408.58 | 15 | 15 | 15 | 15 | 0 | 0 |
| 2962 | 408.57 | 403.64 | 15 | 14 | 14 | 15 | -1 | 1 |
| 2963 | 403.64 | 403.64 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2964 | 398.78 | 413.47 | 13 | 16 | 13 | 16 | 0 | 0 |
| 2965 | 403.65 | 408.58 | 14 | 15 | 14 | 15 | 0 | 0 |
| 2966 | 403.66 | 403.66 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2967 | 403.64 | 403.64 | 14 | 14 | 14 | 14 | 0 | 0 |
| 2968 | 398.78 | 403.73 | 13 | 14 | 13 | 14 | 0 | 0 |

3. Análisis de frecuencias alélicas y genotípicas.

Los alelos mostraron una distribución unimodal no normal (Shapiro-Wilk test $p\text{-value}=3.18 \times 10^{-6}$), con un rango de 11-17 repeticiones y un promedio de 14 ± 1.13 ($\bar{x} \pm \text{DE}$). El alelo más frecuente (47.96%) fue el de 14 repeticiones (fig. 5), lo que coincide con lo observado en la mayoría de poblaciones estudiadas hasta ahora, excepto la población europea, donde 13 pentanucleótidos es el alelo más común, seguido por 14 repeticiones (tabla 7). Se encontraron 3 alelos normales largos (3.06%), todos de 17 repeticiones. No se encontró ningún alelo de 18 o más repeticiones. Se comparó la distribución alélica de la muestra quechua de Puno con la distribución descrita en Finlandia (Juvonen et al. 2005, p. 251). No se detectaron diferencias mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov ($p\text{-value} = 0.893$), ni mediante la prueba exacta de Fisher ($p\text{-value} = 0.732$) empleando cien mil simulaciones. Las distribuciones de Puno y Finlandia se comparan en la fig. 6.

Se empleó una prueba chi-cuadrado para evaluar si existen diferencias en la frecuencia de alelos normales largos en las muestras de Puno, Finlandia (Juvonen et al. 2005), y una muestra combinada que incluye individuos de México, Europa y Japón – denominada muestra Matsuura en adelante (Tabla) (Matsuura et al. 2000; 2006). Se utilizó la corrección de Yates debido a que el número de grados de libertad fue uno (Zar 1998). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre Puno y Finlandia ($p = 0.327$), Puno y la muestra Matsuura ($p\text{-value} = 0.199$), ni Finlandia y la muestra Matsuura ($p\text{-value} = 0.614$). En la muestra Matsuura ($n = 604$), la frecuencia de alelos de 17 o más repeticiones fue de 7.1% (43/604); mientras que en Finlandia la frecuencia del alelo de 17 repeticiones es 3.98% (20/502), y la frecuencia de alelos de 17 o más pentanucleótidos es de 6.18% (31/502) (Juvonen et al. 2005).

Tabla 6. Frecuencia de alelos normales largos en tres muestras.

| | Puno | Finlandia | *Matsuura |
|------------------------|------------|-------------|-------------|
| Alelos normales | 95 (96.9%) | 471 (93.8%) | 561 (92.9%) |
| Alelos normales largos | 3 (3.1%) | 31 (6.2%) | 43 (7.1%) |

*: Muestra combinada de México, Japón y Europa (Matsuura et al. 2000)

Se observó desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P\text{-value} = 0.0063 \pm 0.0021$ [S.E]) con un marcado déficit de heterocigotos debido, presumiblemente, a la consanguinidad: Índice $F_{is} = 0.308$, calculado mediante el método de (Weir y Cockerham 1984). Este resultado sería atribuible al pequeño tamaño de la comunidad de Coata, Puno, de donde se obtuvieron las muestras. La desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg contrasta con lo observado en la muestra Matsuura, que incluye individuos de población mexicana, europea y japonesa (tabla 7). Finalmente, se observó una heterocigocidad de 0.49, bastante menor a la reportada en Chipre, en la muestra Matsuura (tabla 7) y en Venezuela (Paradisi, Ikonomu y Arias 2016).

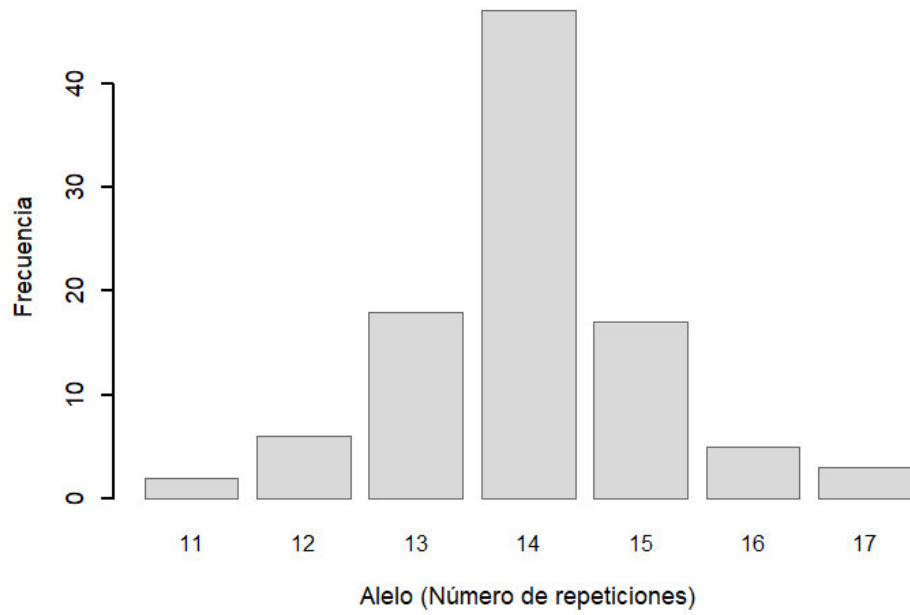


Figura 5. Gráfico de barras de los alelos identificados, mediante electroforesis capilar, en la muestra quechua.

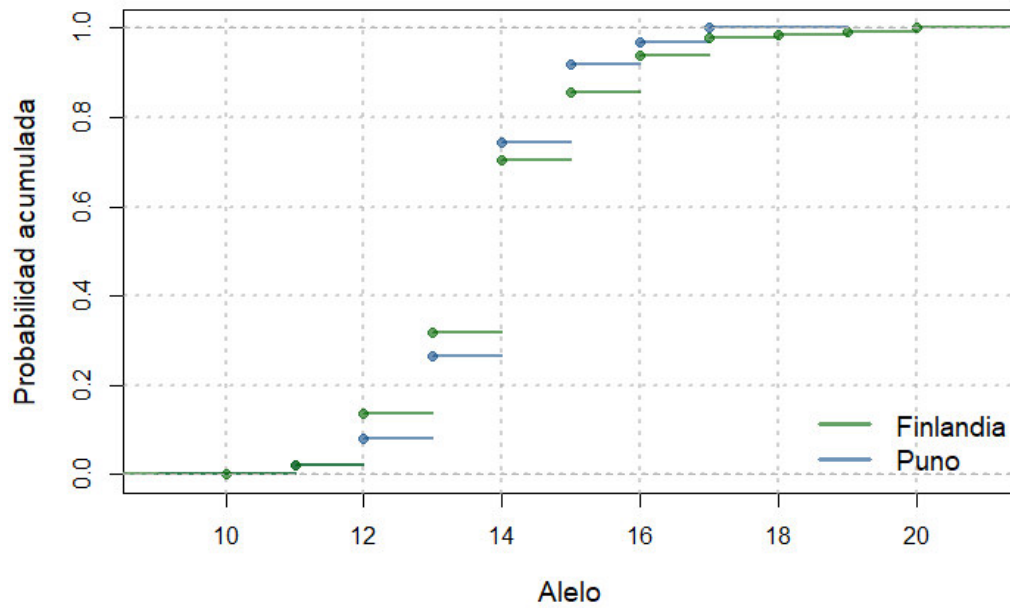


Figura 6. Distribución empírica acumulada del tamaño de los alelos en una muestra de Finlandia y una de Puno. La distribución en ambas muestras fue similar.

Tabla 7. Resumen sobre la distribución de alelos del microsatélite ATTCT del gen *ATXN10* en diferentes poblaciones

| | N [†] | HWE [‡] | Moda (Frecuencia %) | Media | Rango | Heterocigocidad | Referencia |
|-----------|----------------|------------------|---------------------|-------|---------|-----------------|------------------------|
| Perú | 98 | No | 14 (48%) | 14 | 11 a 17 | 0.49 | Este estudio |
| Finlandia | 502 | ND* | 14 (38.6%) | 14.07 | 10 a 20 | ND | (Juvonen et al. 2005) |
| Chipre | 116 | ND | 14 (37%) | ND | 10 a 20 | 0.81 | (Votsi et al. 2012) |
| Japón | 100 | Sí | 14(27%) | ND | 10 a 20 | | |
| Europa | 250 | Sí | 13 (30%) | ND | 11 a 20 | 0.82 | (Matsuura et al. 2000) |
| México | 254 | Sí | 14 (29%) | ND | 11 a 22 | | |

†: Número de cromosomas (dos veces el número de individuos)

‡: Equilibrio de Hardy-Weinberg

*ND: No determinado

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la distribución de alelos del microsatélite ATTCT del gen *ATXN10* en una población quechua de Puno. El objetivo de este análisis fue evaluar si existe alguna relación entre la distribución de alelos de este microsatélite en población normal y la frecuencia relativamente alta —en comparación a otras poblaciones— de SCA10 en población con ancestría nativa americana (Matsuura et al. 2002). Asimismo, se compararon los resultados de la genotipificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida —empleada en el CIBN— con la electroforesis capilar, considerada el *gold standard* para la genotipificación de microsatélites.

La estandarización de la PCR para amplificar el microsatélite ATTCT del gen *ATXN10* no presentó mayor dificultad. Esto contrasta con lo que sucede con los microsatélites asociados a dolencias como enfermedad de Huntington, síndrome de X frágil, etc. (Goldberg et al. 1993; Filipovic-Sadic et al. 2010). Esta diferencia podría deberse a la baja tendencia que tiene el microsatélite ATTCT a formar complejas estructuras secundarias (Potaman et al. 2003) sí presentes en los microsatélites expandidos ricos en C y G de aquellas enfermedades (Marquis Gacy et al. 1995; Moore et al. 1999).

Se encontró una alta concordancia entre los resultados obtenidos mediante electroforesis capilar y electroforesis en gel de poliacrilamida (fig.4 y tabla 5). Por ejemplo, el coeficiente de correlación intraclase en un modelo mixto que consideró efectos fijos para la metodología y efectos aleatorios para las muestras analizadas, fue de 0.929, lo que se interpreta como una excelente concordancia absoluta entre ambos métodos (Koo y Li 2016). Asimismo, el coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.935. Debido a la carencia de un sistema de electroforesis capilar en el CIBN,

todos los análisis de genotipificación, tanto para investigación como para diagnóstico se realizan mediante PAGE. Los resultados obtenidos en este estudio indican que la metodología empleada en el CIBN permite genotipificar con gran exactitud –y a bajo costo– el microsatélite ATTCT del gen *ATXN10* en individuos no afectados con SCA10.

La distribución alélica fue unimodal y aproximadamente simétrica, pero no normal (Shapiro-Wilk test p-value = 3.177×10^{-6}). Muestras de población control de México, Japón, Europa (Matsuura et al. 2000) y Finlandia (Juvonen et al. 2005) también presentaron distribución unimodal aproximadamente simétricas. La frecuencia de alelos normales largos (≥ 17 repeticiones) fue muy baja (3.06%), en concordancia con lo encontrado en una muestra de Finlandia y una muestra combinada de México, Europa y Japón (Tabla). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de alelos normales largos entre estas tres poblaciones.

La distribución de alelos del microsatélite ATTCT del gen *ATXN10* en la muestra quechua de Puno fue similar a la observada en Finlandia y en una muestra combinada de individuos de México, Japón y Europa (fig. 6 y tablas 6 y 7). El alelo con 14 repeticiones fue el más común en este estudio, y concuerda con lo reportado en la mayoría de estudios, a excepción de una muestra europea, donde este alelo fue el segundo más frecuente, superado solo por el alelo de 13 pentanucleótidos, el cual ocupa la segunda posición en las demás poblaciones (Matsuura et al. 2000). El rango observado en este estudio (11-17 repeticiones) fue menor que el observado en otras poblaciones, lo que podría deberse al escaso tamaño de la muestra empleada (n=49). La media aritmética del número de repeticiones en la muestra

quechua (14 pentanucleótidos) fue similar a la media reportada en una muestra finlandesa (14.07) (Juvonen et al. 2005). Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la distribución acumulada empírica en la muestra quechua y en la muestra finlandesa (Figura 6). No pudo realizarse esta comparación con otras poblaciones debido a que los datos necesarios no se encuentran disponibles.

Las frecuencias genotípicas en la población quechua de Puno estudiada fue diferente a la de otras poblaciones, a pesar de que las frecuencias alélicas sí fueron similares. El microsatélite ATTCT no mostró equilibrio de Hardy-Weinberg en la muestra quechua, en contraposición a lo observado en la muestra combinada de Europa, México y Japón (tabla 7). Asimismo, se observó una baja heterocigocidad (0.49) en comparación a Chipre (0.81), Venezuela (0.82) y a las otras tres poblaciones antes mencionadas (0.82) (tabla 7). Finalmente, el índice Fis (0.3) reveló niveles de consanguinidad muy altos en la comunidad quechua de Coata, Puno; lo que explicaría por qué las frecuencias genotípicas de esta localidad fueron tan distintas a las de otras poblaciones a pesar de que las frecuencias alélicas sí fueron similares.

La limitada distribución geográfica de SCA10 tendría dos posibles explicaciones: a) La mutación tiene un único origen ancestral en una población nativa americana o proto-americana (Bushara et al. 2013; Wang et al. 2015); b) La mutación ha ocurrido en más de una ocasión, pero se observa de manera casi exclusiva en población con ancestría nativa americana debido a que en esta el gen *ATXN10* presenta una mayor tendencia a expandirse. Esta mayor tasa de mutación podría explicarse por la distribución de los alelos del microsatélite ATTCT en población general, tal como se explica más adelante.

La frecuencia de varias enfermedades causadas por la expansión de microsatélites está asociada a la frecuencia de alelos normales largos en la población general. Por ejemplo, La prevalencia de MJD/SCA3, SCA6 y Atrofia dentato-rubro-pallidoluysian (DRPLA; causada también por la expansión de tripletes repetitivos) es mayor en la población japonesa que en la caucásica; mientras que la frecuencia de SCA1 y SCA2, por el contrario, es mayor en población caucásica (Takano et al. 1998). Este comportamiento coincide con una mayor frecuencia de alelos grandes de MJD/SCA3, SCA6 y DRPLA en la población japonesa que en la caucásica, y se cumple lo contrario con los alelos grandes de SCA1 y SCA2 (Takano et al. 1998).

Además, un estudio que comparó la distribución del microsatélite CAG del gen *HTT* (cuya expansión causa la enfermedad de Huntington) en poblaciones de Finlandia, China, Japón, África y varios países del oeste de Europa (donde la enfermedad de Huntington tiene una mayor prevalencia) encontró que la distribución de alelos en población sana difiere entre las localidades con alta y baja prevalencia de la enfermedad de Huntington, observándose alelos con un tamaño promedio mayor en los países del oeste de Europa, donde la frecuencia de la enfermedad de Huntington es mayor (Squitieri et al. 1994). Asimismo, la prevalencia de la enfermedad de Huntington está correlacionada con la frecuencia de alelos normales largos (Kay et al. 2018); y la tasa de mutación del microsatélite de *HTT* incrementa con el número de repeticiones (Semaka et al. 2013).

Estas observaciones sugieren que los alelos normales grandes de varios microsatélites inestables son más propensos a alcanzar tamaños patogénicos que los alelos normales pequeños, y que la frecuencia elevada de alelos normales largos en diferentes poblaciones sería parcialmente responsable de la prevalencia elevada

de diferentes ataxias espinocerebelosas en algunas poblaciones (Kay et al. 2018; Takano et al. 1998).

En este estudio no se encontró evidencia que respalde la hipótesis de que la alta frecuencia de SCA10 en el Perú guarde relación con la distribución de alelos en la población sana; ya que la distribución de alelos de *ATXN10* fue similar a la observada en poblaciones donde esta enfermedad está ausente (fig. 7, tablas 6 y 7). Cabe destacar que ya se había observado que la distribución alélica en población control de México (donde SCA10 también presenta una alta frecuencia poblacional) es similar a la distribución en Europa y Japón (Matsuura et al. 2000). Sin embargo, este es el primer estudio que analiza la distribución en una población nativa americana.

Se ha postulado que la mutación de *ATXN10* tendría un único origen ancestral (Almeida et al. 2009). Esta habría ocurrido en una población anterior a la divergencia de un grupo proto-amerindio y la población ancestral del este de Asia, o en una población nativa americana y habría llegado al este de Asia con grupos que migraron de regreso a través del estrecho de Bering (Bushara et al. 2013; Wang et al. 2015). Estas hipótesis se basan en que, a excepción de un caso de China (Wang et al. 2015) y uno de Japón (Naito et al. 2017), todos los pacientes con SCA10 poseen algún grado de ancestría nativa americana (Grewal et al. 2002; Teive et al. 2010; Rasmussen et al. 2001; Gatto et al. 2007; Roxburgh et al. 2013), incluyendo un caso en un miembro de la tribu Sioux de Norteamérica (Bushara et al. 2013). Además, una búsqueda de esta mutación en un grupo de 169 familias con ataxia hereditaria no encontró ningún caso de SCA10 en población japonesa, española, italiana, franco-canadiense ni blanca norteamericana (Matsuura et al. 2002).

Varios estudios de haplotipos respaldarían la hipótesis de que la expansión de *ATXN10* tiene un único origen ancestral. Por ejemplo, un estudio en población mexicana y brasilera encontró que un haplotipo (CGGC) formado por 4 SNPs circundantes al gen *ATXN10* se encuentra en una alta frecuencia en los cromosomas portadores de la mutación (Almeida et al. 2009). Sobre la base de estos resultados, los autores propusieron que la expansión del microsatélite inestable de *ATXN10* habría ocurrido en una población amerindia mexicana y que el alelo mutado ancestral se habría distribuido de norte a sur por México, Brasil y, probablemente, otras poblaciones amerindias durante el poblamiento de América (Almeida et al. 2009). Estudios de haplotipos posteriores en pacientes con SCA10 de China, Japón, Venezuela y la tribu Sioux de Norteamérica, también revelaron la presencia única del haplotipo CGGC en los cromosomas portadores de la expansión de *ATXN10*, lo que ha sido interpretado como evidencia adicional que respalda la hipótesis de un único origen ancestral de la expansión de *ATXN10* (Bushara et al. 2013; Wang et al. 2015; Naito et al. 2017; Paradisi, Ikonomu y Arias 2016).

La evidencia actual no es suficiente para confirmar sin lugar a dudas que la expansión de *ATXN10* tiene un único origen ancestral. El haplotipo CGGC muestra una frecuencia muy similar en la muestra control de 49 individuos quechua (los mismos que fueron empleados en este estudio) y los cromosomas portadores de la expansión de *ATXN10* (Bampi et al. 2017). Además, la asociación entre el haplotipo CGGC y el alelo expandido no ha alcanzado significancia estadística en ninguno de los estudios realizados hasta la actualidad; aunque ello podría deberse al escaso tamaño muestral empleado en estos estudios (Almeida et al. 2009; Bampi et al. 2017). De otro lado, el haplotipo CGGC presenta una elevada frecuencia (>60%) en

poblaciones sanas de Brasil, México y Portugal, lo que podría explicar su también elevada frecuencia en los cromosomas portadores de la expansión de *ATXN10* (Almeida et al. 2009). Finalmente, al expandir el análisis de haplotipos con dos 2 microsatélites cercanos, se observó asociación estadísticamente significativa entre un haplotipo (8CGGC1) y SCA10 en población brasilera, mas no en población mexicana (Almeida et al. 2009). Tampoco se ha encontrado asociación entre el haplotipo expandido (formado por 4 SNPs y 2 STRs) y SCA10 en una muestra de 27 pacientes peruanos provenientes de 21 familias; ni en una muestra de 29 pacientes de 16 familias brasileras (Bampi et al. 2017).

Finalmente, la distribución alélica encontrada no respalda la hipótesis de una posible alta frecuencia poblacional de alelos normales largos, que actuarían como fuente de mutaciones *de novo*. Asimismo, los resultados no contradicen la hipótesis más probable de un único origen ancestral de la mutación. Sin embargo, es necesario recalcar que se requieren estudios adicionales para verificar la veracidad de esta hipótesis.

CONCLUSIONES

- Los alelos normales largos presentan una baja frecuencia poblacional en una muestra quechua de Puno
- La frecuencia de alelos normales largos en una muestra quechua de Puno es similar a la de otras poblaciones.
- La distribución de alelos en una muestra quechua de Puno no respalda la hipótesis de que la frecuencia relativamente alta de SCA10 en el Perú se debe a la distribución de alelos en la población general de Perú.
- Existe un excelente grado de concordancia entre los genotipos estimados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y electroforesis capilar.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar con más detalle el origen de la expansión de *ATXN10*, específicamente, evaluar la asociación de haplotipos más densos (conformados por mayor número de SNPs) con la expansión del microsatélite utilizando un mayor número de muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abstracts of The Movement Disorder Society's Thirteenth International Congress of Parkinson's Disease and Movement Disorders. *Movement Disorders*, 2009. vol. 24, no. S1, pp. S1–S653. ISSN 1531-8257. DOI 10.1002/mds.22628.
- ALMEIDA, T., ALONSO, I., MARTINS, S., RAMOS, E.M., AZEVEDO, L., OHNO, K., AMORIM, A., SARAIVA-PEREIRA, M.L., JARDIM, L.B., MATSUURA, T., SEQUEIROS, J. y SILVEIRA, I., 2009. Ancestral Origin of the ATTCT Repeat Expansion in Spinocerebellar Ataxia Type 10 (SCA10). *PLoS ONE*, vol. 4, no. 2, pp. e4553. DOI 10.1371/journal.pone.0004553.
- ALONSO, I., JARDIM, L.B., ARTIGALAS, O., SARAIVA-PEREIRA, M.L., MATSUURA, T., ASHIZAWA, T., SEQUEIROS, J. y SILVEIRA, I., 2006. Reduced penetrance of intermediate size alleles in spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology*, vol. 66, no. 10, pp. 1602-1604. ISSN 1526-632X. DOI 10.1212/01.wnl.0000216266.30177.bb.
- BAMPI, G.B., BISSO-MACHADO, R., HÜNEMEIER, T., GHENO, T.C., FURTADO, G.V., VELIZ-OTANI, D., CORNEJO-OLIVAS, M., MAZZETI, P., BORTOLINI, M.C., JARDIM, L.B., SARAIVA-PEREIRA, M.L. y NEUROGENETICA, on behalf of R., 2017. Haplotype Study in SCA10 Families Provides Further Evidence for a Common Ancestral Origin of the Mutation. *NeuroMolecular Medicine*, vol. 19, no. 4, pp. 501-509. ISSN 1535-1084, 1559-1174. DOI 10.1007/s12017-017-8464-8.
- BATRA, R., CHARIZANIS, K. y SWANSON, M.S., 2010. Partners in crime: bidirectional transcription in unstable microsatellite disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 19, no. R1, pp. R77-R82. ISSN 0964-6906, 1460-2083. DOI 10.1093/hmg/ddq132.
- BUSHARA, K., BOWER, M., LIU, J., MCFARLAND, K.N., LANDRIAN, I., HUTTER, D., TEIVE, H.A.G., RASMUSSEN, A., MULLIGAN, C.J. y ASHIZAWA, T., 2013. Expansion of the Spinocerebellar Ataxia Type 10 (SCA10) Repeat in a Patient with Sioux Native American Ancestry. *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, pp. e81342. DOI 10.1371/journal.pone.0081342.
- CHERNG, N., SHISHKIN, A.A., SCHLAGER, L.I., TUCK, R.H., SLOAN, L., MATERA, R., SARKAR, P.S., ASHIZAWA, T., FREUDENREICH, C.H. y MIRKIN, S.M., 2011. Expansions, contractions, and fragility of the spinocerebellar ataxia type 10 pentanucleotide repeat in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 7, pp. 2843-2848. ISSN 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.1009409108.

- CORNEJO OLIVAS, M., CORNEJO-HERRERA, I., LINDO-SAMANAMUD, S., CASTILHOS, R., SARAIVA-PEREIRA, M.L., JARDIM, L. y MAZZETTI SOLER, P., 2013. Spinocerebellar Ataxia Type 10 or SCA10 in Peruvian Population. First Report of Three Families (PD2.006). *Neurology*, vol. 80, no. Meeting Abstracts 1, pp. PD2.006. ISSN 0028-3878.
- CORNEJO-OLIVAS M, CHACÓN R, ORTEGA O, MARCA V, TIMANÁ C, TORRES G, FLORES M, COSENTINO C, TORRES L y MAZZETTI P, 2011. Frequency of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) or machado joseph disease in a peruvian population. *International Congress of The Movement Disorders Society*. Toronto: s.n.,
- CORNEJO-OLIVAS, M., MARCA, V., DORSCHNER, M.O., INCA MARTINEZ, M., MEDINA, A., SHETTY, A.C., KUMARI, P., ESPINOZA-HUERTAS, K., VELIZ-OTANI, D., INCATICUPA, D., MARCA, V., ORTEGA, O., MAZZETTI, P., ZABETIAN, C., O'CONNOR, T.D. y LATIN AMERICAN RESEARCH CONSORTIUM ON THE GENETICS OF PARKINSON'S DISEASE (LARGE-PD), 2014. Target sequencing analysis of Parkinson's disease genes in a healthy Amerindian Population from Puno-Peru. [en línea]. San Diego, California, USA: s.n., [Consulta: 2 julio 2018]. Disponible en: <http://www.ashg.org/2014meeting/abstracts/fulltext/f140122321.htm>.
- DURR, A., 2010. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet neurology*, vol. 9, no. 9, pp. 885-894. ISSN 1474-4465. DOI 10.1016/S1474-4422(10)70183-6.
- FALUSH, D., ALMQVIST, E.W., BRINKMANN, R.R., IWASA, Y. y HAYDEN, M.R., 2001. Measurement of mutational flow implies both a high new-mutation rate for Huntington disease and substantial underascertainment of late-onset cases. *American Journal of Human Genetics*, vol. 68, no. 2, pp. 373-385. ISSN 0002-9297. DOI 10.1086/318193.
- FILIPOVIC-SADIC, S., SAH, S., CHEN, L., KROSTING, J., SEKINGER, E., ZHANG, W., HAGERMAN, P.J., STENZEL, T.T., HADD, A., LATHAM, G.J. y TASSONE, F., 2010. A Novel FMR1 PCR Method that Reproducibly Amplifies Fragile X Full Mutations in Concordance with Southern Blotting and Reliably Detects Low Abundance Expanded Alleles. *Clinical chemistry*, vol. 56, no. 3, pp. 399-408. ISSN 0009-9147. DOI 10.1373/clinchem.2009.136101.
- GATTO, E.M., GAO, R., WHITE, M.C., ROCA, M.C.U., ETCHEVERRY, J.L., PERSI, G., PODEROSO, J.J. y ASHIZAWA, T., 2007. Ethnic Origin and Extrapyrarnidal Signs in an Argentinean Spinocerebellar Ataxia Type 10 Family. *Neurology*, vol. 69, no. 2, pp. 216-218. ISSN 0028-3878, 1526-632X. DOI 10.1212/01.wnl.0000265596.72492.89.

- GOLDBERG, Y.P., ANDREW, S.E., CLARKE, L.A. y HAYDEN, M.R., 1993. A PCR method for accurate assessment of trinucleotide repeat expansion in Huntington disease. *Human Molecular Genetics*, vol. 2, no. 6, pp. 635-636. ISSN 0964-6906. DOI 10.1093/hmg/2.6.635.
- GREWAL, R.P., ACHARI, M., MATSUURA, T., DURAZO, A., TAYAG, E., ZU, L., PULST, S.M. y ASHIZAWA, T., 2002. Clinical features and ATTCT repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 10. *Archives of neurology*, vol. 59, no. 8, pp. 1285-1290. ISSN 0003-9942.
- GREWAL, R.P., TAYAG, E., FIGUEROA, K.P., ZU, L., DURAZO, A., NUNEZ, C. y PULST, S.M., 1998. Clinical and genetic analysis of a distinct autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurology*, vol. 51, no. 5, pp. 1423-1426. ISSN 0028-3878.
- HARDING, A.E., 1988. The inherited ataxias. *Advances in neurology*, vol. 48, pp. 37-46. ISSN 0091-3952.
- JUNG GOOK LIM, 2012. *Molecular Pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia type 10* [en línea]. S.I.: The University of Texas Medical Branch. [Consulta: 26 julio 2013]. Disponible en: <https://repositories.tdl.org/utmb-ir/handle/2152.3/543>.
- JUVONEN, V., HIETALA, M., KAIRISTO, V. y SAVONTAUS, M.-L., 2005. The occurrence of dominant spinocerebellar ataxias among 251 Finnish ataxia patients and the role of predisposing large normal alleles in a genetically isolated population. *Acta neurologica Scandinavica*, vol. 111, no. 3, pp. 154-162. ISSN 0001-6314. DOI 10.1111/j.1600-0404.2005.00349.x.
- KAY, C., COLLINS, J.A., WRIGHT, G.E.B., BAINE, F., MIEDZYBRODZKA, Z., AMINKENG, F., SEMAKA, A.J., MCDONALD, C., DAVIDSON, M., MADORE, S.J., GORDON, E.S., GERRY, N.P., CORNEJO-OLIVAS, M., SQUITIERI, F., TISHKOFF, S., GREENBERG, J.L., KRAUSE, A. y HAYDEN, M.R., 2018. The molecular epidemiology of Huntington disease is related to intermediate allele frequency and haplotype in the general population. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, vol. 177, no. 3, pp. 346-357. ISSN 1552-485X. DOI 10.1002/ajmg.b.32618.
- KEMP, M., BAE, B., YU, J.P., GHOSH, M., LEFFAK, M. y NAIR, S.K., 2007. Structure and Function of the c-myc DNA-unwinding Element-binding Protein DUE-B. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 14, pp. 10441-10448. ISSN 0021-9258, 1083-351X. DOI 10.1074/jbc.M609632200.
- KEREN, B., JACQUETTE, A., DEPIENNE, C., LEITE, P., DURR, A., CARPENTIER, W., BENYAHIA, B., PONSOT, G., SOUBRIER, F., BRICE,

- A. y HÉRON, D., 2009. Evidence against haploinsufficiency of human ataxin 10 as a cause of spinocerebellar ataxia type 10. *neurogenetics*, vol. 11, no. 2, pp. 273-274. ISSN 1364-6745, 1364-6753. DOI 10.1007/s10048-009-0227-8.
- KLOCKGETHER, T., LÜDTKE, R., KRAMER, B., ABELE, M., BÜRK, K., SCHÖLS, L., RIESS, O., LACCONE, F., BOESCH, S., LOPES-CENDES, I., BRICE, A., INZELBERG, R., ZILBER, N. y DICHGANS, J., 1998. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain: a journal of neurology*, vol. 121 (Pt 4), pp. 589-600. ISSN 0006-8950.
- KOEPPEN, A., 2005. The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *The Cerebellum*, vol. 4, no. 1, pp. 62-73. ISSN 1473-4222. DOI 10.1080/14734220510007950.
- KOO, T.K. y LI, M.Y., 2016. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *Journal of Chiropractic Medicine*, vol. 15, no. 2, pp. 155-163. ISSN 1556-3707. DOI 10.1016/j.jcm.2016.02.012.
- LEONARDI, L., MARCOTULLI, C., MCFARLAND, K.N., TESSA, A., DIFABIO, R., SANTORELLI, F.M., PIERELLI, F., ASHIZAWA, T. y CASALI, C., 2014. Spinocerebellar ataxia type 10 in Peru: the missing link in the Amerindian origin of the disease. *Journal of Neurology*, pp. 1-4. ISSN 0340-5354, 1432-1459. DOI 10.1007/s00415-014-7394-8.
- LIU, G., BISSLER, J.J., SINDEN, R.R. y LEFFAK, M., 2007. Unstable Spinocerebellar Ataxia Type 10 (ATTCT)·(AGAAT) Repeats Are Associated with Aberrant Replication at the ATX10 Locus and Replication Origin-Dependent Expansion at an Ectopic Site in Human Cells. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 27, no. 22, pp. 7828-7838. ISSN 0270-7306, 1098-5549. DOI 10.1128/MCB.01276-07.
- LUDGER SCHÖLS, PETER BAUER, THORSTEN SCHMIDT, THORSTEN SCHULTE y OLAF RIESS, 2004. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. , pp. 291–304.
- MARQUIS GACY, A., GOELLNER, G., JURANIĆ, N., MACURA, S. y MCMURRAY, C.T., 1995. Trinucleotide repeats that expand in human disease form hairpin structures in vitro. *Cell*, vol. 81, no. 4, pp. 533-540. ISSN 0092-8674. DOI 10.1016/0092-8674(95)90074-8.
- MATILLA, T., VOLPINI, V., GENÍS, D., ROSELL, J., CORRAL, J., DÁVALOS, A., MOLINS, A. y ESTIVILL, X., 1993. Presymptomatic analysis of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) via the expansion of the SCA1 CAG-repeat in a large pedigree displaying anticipation and parental male bias. *Human molecular genetics*, vol. 2, no. 12, pp. 2123-2128. ISSN 0964-6906.

- MATSUURA, T., ACHARI, M., KHAJAVI, M., BACHINSKI, L.L., ZOGHBI, H.Y. y ASHIZAWA, T., 1999. Mapping of the gene for a novel spinocerebellar ataxia with pure cerebellar signs and epilepsy. *Annals of Neurology*, vol. 45, no. 3, pp. 407–411. ISSN 1531-8249. DOI 10.1002/1531-8249(199903)45:3<407::AID-ANA21>3.0.CO;2-D.
- MATSUURA, T. y ASHIZAWA, T., 1993. Spinocerebellar Ataxia Type 10. En: R.A. PAGON, M.P. ADAM, T.D. BIRD, C.R. DOLAN, C.-T. FONG y K. STEPHENS (eds.), *GeneReviews*TM [en línea]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, [Consulta: 27 junio 2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1175/>. NBK1175
- MATSUURA, T., FANG, P., PEARSON, C.E., JAYAKAR, P., ASHIZAWA, T., ROA, B.B. y NELSON, D.L., 2006. Interruptions in the Expanded ATTCT Repeat of Spinocerebellar Ataxia Type 10: Repeat Purity as a Disease Modifier? *American Journal of Human Genetics*, vol. 78, no. 1, pp. 125-129. ISSN 0002-9297.
- MATSUURA, T., RANUM, L.P.W., VOLPINI, V., PANDOLFO, M., SASAKI, H., TASHIRO, K., WATASE, K., ZOGHBI, H.Y. y ASHIZAWA, T., 2002. Spinocerebellar ataxia type 10 is rare in populations other than Mexicans. *Neurology*, vol. 58, no. 6, pp. 983-983. ISSN 0028-3878, 1526-632X. DOI 10.1212/WNL.58.6.983.
- MATSUURA, T., YAMAGATA, T., BURGESS, D.L., RASMUSSEN, A., GREWAL, R.P., WATASE, K., KHAJAVI, M., MCCALL, A.E., DAVIS, C.F., ZU, L., ACHARI, M., PULST, S.M., ALONSO, E., NOEBELS, J.L., NELSON, D.L., ZOGHBI, H.Y. y ASHIZAWA, T., 2000. Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nature genetics*, vol. 26, no. 2, pp. 191-194. ISSN 1061-4036. DOI 10.1038/79911.
- MONOI, H., FUTAKI, S., KUGIMIYA, S., MINAKATA, H. y YOSHIHARA, K., 2000. Poly-l-Glutamine Forms Cation Channels: Relevance to the Pathogenesis of the Polyglutamine Diseases. *Biophysical Journal*, vol. 78, no. 6, pp. 2892-2899. ISSN 0006-3495. DOI 10.1016/S0006-3495(00)76830-5.
- MOORE, H., GREENWELL, P.W., LIU, C.-P., ARNHEIM, N. y PETES, T.D., 1999. Triplet repeats form secondary structures that escape DNA repair in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96, no. 4, pp. 1504-1509. ISSN 0027-8424, 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.96.4.1504.
- NAITO, H., TAKAHASHI, T., KAMADA, M., MORINO, H., YOSHINO, H., HATTORI, N., MARUYAMA, H., KAWAKAMI, H. y MATSUMOTO, M., 2017. First report of a Japanese family with spinocerebellar ataxia type 10:

- The second report from Asia after a report from China. *PLOS ONE*, vol. 12, no. 5, pp. e0177955. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0177955.
- NELSON, D.L., ORR, H.T. y WARREN, S.T., 2013. The unstable repeats--three evolving faces of neurological disease. *Neuron*, vol. 77, no. 5, pp. 825-843. ISSN 1097-4199. DOI 10.1016/j.neuron.2013.02.022.
- PANOV, A.V., GUTEKUNST, C.-A., LEAVITT, B.R., HAYDEN, M.R., BURKE, J.R., STRITTMATTER, W.J. y GREENAMYRE, J.T., 2002. Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nature Neuroscience*, vol. 5, no. 8, pp. 731-736. ISSN 1097-6256. DOI 10.1038/nn884.
- PARADISI, I., IKONOMU, V. y ARIAS, S., 2016. Spinocerebellar ataxias in Venezuela: genetic epidemiology and their most likely ethnic descent. *Journal of Human Genetics*, vol. 61, no. 3, pp. 215-222. ISSN 1435-232X. DOI 10.1038/jhg.2015.131.
- PARK, S.-H., KUKUSHKIN, Y., GUPTA, R., CHEN, T., KONAGAI, A., HIPPI, M.S., HAYER-HARTL, M. y HARTL, F.U., 2013. PolyQ Proteins Interfere with Nuclear Degradation of Cytosolic Proteins by Sequestering the Sis1p Chaperone. *Cell*, vol. 154, no. 1, pp. 134-145. ISSN 0092-8674, 1097-4172. DOI 10.1016/j.cell.2013.06.003.
- POTAMAN, V.N., BISSLER, J.J., HASHEM, V.I., OUSSATCHEVA, E.A., LU, L., SHLYAKHTENKO, L.S., LYUBCHENKO, Y.L., MATSUURA, T., ASHIZAWA, T., LEFFAK, M., BENHAM, C.J. y SINDEN, R.R., 2003. Unpaired Structures in SCA10 (ATTCT)_n·(AGAAT)_n Repeats. *Journal of Molecular Biology*, vol. 326, no. 4, pp. 1095-1111. ISSN 0022-2836. DOI 10.1016/S0022-2836(03)00037-8.
- RANEN, N.G., STINE, O.C., ABBOTT, M.H., SHERR, M., CODORI, A.-M., FRANZ, M.L., CHAO, N.I., CHUNG, A.S., PLEASANT, N., CALLAHAN, C., KASCH, L.M., GHAFARI, M., CHASE, G.A., KAZAZIAN, H.H., BRANDT, J., FOLSTEIN, S.E. y ROSS, C.A., 1995. Anticipation and Instability of IT-15 (CAG)_N Repeats in Parent-Offspring Pairs with Huntington Disease. *American Journal of Human Genetics*, vol. 57, no. 3, pp. 593-602. ISSN 0002-9297.
- RASKIN, S., ASHIZAWA, T., TEIVE, H.A., ARRUDA, W.O., FANG, P., GAO, R., WHITE, M.C., WERNECK, L.C. y ROA, B., 2007. Reduced penetrance in a Brazilian family with spinocerebellar ataxia type 10. *Archives of neurology*, vol. 64, no. 4, pp. 591-594.
- RASMUSSEN, A., MATSUURA, T., RUANO, L., YESCAS, P., OCHOA, A., ASHIZAWA, T. y ALONSO, E., 2001. Clinical and genetic analysis of 4

- Mexican families with spinocerebellar ataxia type 10. *Annals of Neurology*, vol. 50, no. 2, pp. 234–239. ISSN 1531-8249. DOI 10.1002/ana.1081.
- ROXBURGH, R.H., SMITH, C.O., LIM, J.G., BACHMAN, D.F., BYRD, E. y BIRD, T.D., 2013. The unique co-occurrence of spinocerebellar ataxia type 10 (SCA10) and Huntington disease. *Journal of the neurological sciences*, vol. 324, no. 1-2, pp. 176-178. ISSN 1878-5883. DOI 10.1016/j.jns.2012.09.030.
- SEMAKA, A., KAY, C., DOTY, C., COLLINS, J.A., BIJLSMA, E.K., RICHARDS, F., GOLDBERG, Y.P. y HAYDEN, M.R., 2013. CAG size-specific risk estimates for intermediate allele repeat instability in Huntington disease. *Journal of Medical Genetics*, vol. 50, no. 10, pp. 696-703. ISSN 0022-2593, 1468-6244. DOI 10.1136/jmedgenet-2013-101796.
- SHAH, K.A., SHISHKIN, A.A., VOINEAGU, I., PAVLOV, Y.I., SHCHERBAKOVA, P.V. y MIRKIN, S.M., 2012. Role of DNA polymerases in repeat-mediated genome instability. *Cell Reports*, vol. 2, no. 5, pp. 1088-1095. ISSN 2211-1247. DOI 10.1016/j.celrep.2012.10.006.
- SHAPIRO, A.L., VIÑUELA, E. y V. MAIZEL JR., J., 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 28, no. 5, pp. 815-820. ISSN 0006-291X. DOI 10.1016/0006-291X(67)90391-9.
- SPADA, A.R.L. y TAYLOR, J.P., 2010. Repeat expansion disease: progress and puzzles in disease pathogenesis. *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, no. 4, pp. 247-258. DOI 10.1038/nrg2748.
- SQUITIERI, F., ANDREW, S.E., GOLDBERG, Y.P., KREMER, B., SPENCE, N., ZELSLER, J., NICHOL, K., THEILMANN, J., GREENBERG, J., GOTO, J., KANAZAWA, I., VESA, J., PELTONEN, L., ALMQVIST, E., ANVRET, M., TELENUS, H., LIN, B., NAPOLITANO, G., MORGAN, K. y HAYDEN, M.R., 1994. DNA haplotype analysis of Huntington disease reveals clues to the origins and mechanisms of CAG expansion and reasons for geographic variations of prevalence. *Human Molecular Genetics*, vol. 3, no. 12, pp. 2103-2114. ISSN 0964-6906, 1460-2083. DOI 10.1093/hmg/3.12.2103.
- TABOLACCI, E., MOSCATO, U., ZALFA, F., BAGNI, C., CHIURAZZI, P. y NERI, G., 2008. Epigenetic analysis reveals a euchromatic configuration in the FMR1 unmethylated full mutations. *European journal of human genetics: EJHG*, vol. 16, no. 12, pp. 1487-1498. ISSN 1018-4813. DOI 10.1038/ejhg.2008.130.
- TAKANO, H., CANCEL, G., IKEUCHI, T., LORENZETTI, D., MAWAD, R., STEVANIN, G., DIDIERJEAN, O., DÜRR, A., OYAKE, M., SHIMOHATA,

- T., SASAKI, R., KOIDE, R., IGARASHI, S., HAYASHI, S., TAKIYAMA, Y., NISHIZAWA, M., TANAKA, H., ZOGHBI, H., BRICE, A. y TSUJI, S., 1998. Close associations between prevalences of dominantly inherited spinocerebellar ataxias with CAG-repeat expansions and frequencies of large normal CAG alleles in Japanese and Caucasian populations. *American journal of human genetics*, vol. 63, no. 4, pp. 1060-1066. ISSN 0002-9297. DOI 10.1086/302067.
- TEIVE, H.A.G., 2009. Spinocerebellar ataxias. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 67, no. 4, pp. 1133-1142. ISSN 0004-282X. DOI 10.1590/S0004-282X2009000600035.
- TEIVE, H.A.G., MUNHOZ, R.P., ARRUDA, W.O., RASKIN, S., WERNECK, L.C. y ASHIZAWA, T., 2011. Spinocerebellar ataxia type 10 – A review. *Parkinsonism and Related Disorders*, vol. 17, no. 9, pp. 655-661. ISSN 1353-8020. DOI 10.1016/j.parkreldis.2011.04.001.
- TEIVE, H.A.G., MUNHOZ, R.P., RASKIN, S., ARRUDA, W.O., DE PAOLA, L., WERNECK, L.C. y ASHIZAWA, T., 2010. Spinocerebellar Ataxia Type 10: Frequency of epilepsy in a large sample of Brazilian patients. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, vol. 25, no. 16, pp. 2875-2878. ISSN 0885-3185. DOI 10.1002/mds.23324.
- VOTSI, C., ZAMBA-PAPANICOLAOU, E., GEORGHIOU, A., KYRIAKIDES, T., PAPACOSTAS, S., KLEOPA, K.A., PANTZARIS, M. y CHRISTODOULOU, K., 2012. Investigation of SCA10 in the Cypriot population: further exclusion of SCA dynamic repeat mutations. *Journal of the Neurological Sciences*, vol. 323, no. 1-2, pp. 154-157. ISSN 1878-5883. DOI 10.1016/j.jns.2012.09.006.
- WAKAMIYA, M., MATSUURA, T., LIU, Y., SCHUSTER, G.C., GAO, R., XU, W., SARKAR, P.S., LIN, X. y ASHIZAWA, T., 2006. The role of ataxin 10 in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 10. *Neurology*, vol. 67, no. 4, pp. 607-613. ISSN 0028-3878, 1526-632X. DOI 10.1212/01.wnl.0000231140.26253.eb.
- WANG, J., WU, Y., LEI, L., SHEN, L., JIANG, H., ZHOU, Y., YI, J., ZHOU, J., YAN, X., PAN, Q., XIA, K. y TANG, B., 2010. *Polynucleotide repeat expansion of nine spinocerebellar ataxia subtypes and dentatorubral-pallidoluysian atrophy in healthy Chinese Han population*. S.l.: s.n.
- WANG, J.-L., JIANG, H., ZHANG, S., XU, Q., ZHOU, Y.-F., LIAO, S.-S., SHEN, L., YAN, X.-X., ZHU, H.-X., PAN, Q. y OTHERS, 2008. Lack of variation of ATTCT pentanucleotide repeats at ATXN10 gene between clinically

diagnosed ataxia patients and normal individuals originated from Chinese Han. *Journal of genetics*, vol. 87, no. 3, pp. 283.

- WANG, K., MCFARLAND, K.N., LIU, J., ZENG, D., LANDRIAN, I., XIA, G., HAO, Y., JIN, M., MULLIGAN, C.J., GU, W. y ASHIZAWA, T., 2015. Spinocerebellar ataxia type 10 in Chinese Han. *Neurology: Genetics* [en línea], vol. 1, no. 3. [Consulta: 10 enero 2018]. ISSN 2376-7839. DOI 10.1212/NXG.0000000000000026. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4809459/>.
- WEIR, B.S. y COCKERHAM, C.C., 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, vol. 38, no. 6, pp. 1358-1370. ISSN 0014-3820. DOI 10.2307/2408641.
- WHITE, M., XIA, G., GAO, R., WAKAMIYA, M., SARKAR, P.S., MCFARLAND, K. y ASHIZAWA, T., 2012. Transgenic mice with SCA10 pentanucleotide repeats show motor phenotype and susceptibility to seizure: A toxic RNA gain-of-function model. *Journal of Neuroscience Research*, vol. 90, no. 3, pp. 706-714. ISSN 1097-4547. DOI 10.1002/jnr.22786.
- WHITE, M.C., GAO, R., XU, W., MANDAL, S.M., LIM, J.G., HAZRA, T.K., WAKAMIYA, M., EDWARDS, S.F., RASKIN, S., TEIVE, H.A.G., ZOGHBI, H.Y., SARKAR, P.S. y ASHIZAWA, T., 2010. Inactivation of hnRNP K by Expanded Intronic AUUCU Repeat Induces Apoptosis Via Translocation of PKC δ to Mitochondria in Spinocerebellar Ataxia 10. *PLoS Genet*, vol. 6, no. 6, pp. e1000984. DOI 10.1371/journal.pgen.1000984.
- YANAGISAWA, H., FUJII, K., NAGAFUCHI, S., NAKAHORI, Y., NAKAGOME, Y., AKANE, A., NAKAMURA, M., SANO, A., KOMURE, O., KONDO, I., JIN, D.K., SØRENSEN, S.A., POTTER, N.T., YOUNG, S.R., NAKAMURA, K., NUKINA, N., NAGAO, Y., TADOKORO, K., OKUYAMA, T., MIYASHITA, T., INOUE, T., KANAZAWA, I. y YAMADA, M., 1996. A unique origin and multistep process for the generation of expanded DRPLA triplet repeats. *Human molecular genetics*, vol. 5, no. 3, pp. 373-379. ISSN 0964-6906.
- ZAR, J.H., 1998. *Biostatistical Analysis*. 4 edition. Upper Saddle River, N.J: Prentice Hall. ISBN 978-0-13-081542-2.
- ZU, L., FIGUEROA, K.P., GREWAL, R. y PULST, S.-M., 1999. Mapping of a New Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia to Chromosome 22. *The American Journal of Human Genetics*, vol. 64, no. 2, pp. 594-599. ISSN 0002-9297. DOI 10.1086/302247.

ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONTROLES

ANÁLISIS DEL GEN LRRK2 EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON EN POBLACIÓN PERUANA

PRESENTACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Somos investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN), ante Ud. nos presentamos con la finalidad de invitarle a participar en el estudio relacionado a la enfermedad de Parkinson.

Investigadores Principales:

- Dra. Pilar Mazzetti Soler, Servicio de Neurogenética, Jr. Ancash 1271 – Lima, Teléfono 4117779. Celular: 9996567763
- Dr. Carlos Cosentino Esquerre, Unidad de Movimientos Involuntarios, Jr. Ancash 1271- Lima, teléfono 4117732. Celular: 994117497
- Dr. Luis Torres Ramirez, Unidad de Movimientos Involuntarios, Jr. Ancash 1271 – Lima, teléfono 4117732. Celular: 999377409
- Dr. Mario Cornejo Olivas, Servicio de Neurogenética, Jr. Ancash 1271 – Lima, teléfono 4117779. Celular: 992063146

El propósito de este formato de consentimiento es dar la información necesaria para que libremente decida si Ud. quiere participar o no en el estudio. Puede preguntar todas las dudas que tenga acerca del estudio y solo después que hayan sido contestadas todas sus preguntas podrá decidir si participa o no. Le daremos una copia de este consentimiento.

Nos encontramos desarrollando un trabajo de investigación para estudiar las causas de la enfermedad de Parkinson. Esta es una enfermedad que se caracteriza por dureza de extremidades, lentitud en los movimientos y temblor. Tiene varias causas, muchas de ellas aún desconocidas. En algunos casos es hereditaria. En nuestras células se encuentra el ADN, que almacena nuestra información hereditaria, como si fuera una biblioteca que almacena datos y reciben el nombre de genes. Se ha encontrado que cambios o alteraciones en los genes podrían causar la enfermedad, uno de ellos es la presencia del gen LRRK2 (una parte de ADN) en pacientes con la enfermedad de Parkinson en otras poblaciones. Queremos saber si este tipo de gen está presente en la población peruana. Para este estudio también es importante la participación de personas como Ud. que no tengan la enfermedad de Parkinson como grupo de comparación. Este estudio genético se puede realizar tomando una muestra de sangre.

Este estudio forma parte de un trabajo de investigación a nivel de Latinoamérica, por lo que se cuenta con el apoyo de instituciones extranjeras.

Lo invitamos a participar en este estudio, que consistirá en:

V4 30-04-2013

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Fecha de Aprobación: 06.05.2013
Fecha de Caducidad: 06.05.2014
Dr. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación

Page 1 of 6

- 1) Registro de antecedentes: Se le realizarán preguntas sobre sus antecedentes familiares (le preguntaremos si tiene algún otro familiar con enfermedad de Parkinson), el uso crónico de medicamentos, el consumo de sustancias como café, té, alcohol; exposiciones ambientales. Todo se anotará en un formulario específico. Esta primera parte tomará alrededor de 20 minutos.
- 2) Examen neurológico: Se le realizará un examen neurológico para evaluar las manifestaciones de la enfermedad de Parkinson. Esta segunda parte durará unos 15 minutos.
- 3) Evaluación cognitiva: Se le realizará una prueba para ver cómo está su memoria, su lenguaje, su capacidad de hacer cosas manualmente como dibujar. Se usará una prueba llamada test de Montreal o MoCA. Esta tercera parte tomará alrededor de 10 minutos.
- 4) Toma de muestra de sangre: Se le tomará una muestra de sangre en cantidad aproximada de tres cucharadas soperas para realizar el examen genético (unos 15 ml). La muestra de ADN obtenida a partir de su muestra de sangre será guardada en el Servicio de Neurogenética del Instituto para su utilización en este estudio y en otros relacionados a enfermedad Parkinson.

¿Dónde se analizarán y almacenarán mis muestras?

El análisis y almacenamiento de las muestras se realizarán en colaboración con una institución internacional de gran experiencia en investigación de las causas genéticas de esta enfermedad, el laboratorio de Neurogenética del VA Puget Sound Health Care System en Seattle, Washington, Estados Unidos que coordina el Consorcio latinoamericano para Investigación en Genética de la Enfermedad de Parkinson o LARGE PD. Todo ello siempre garantizando el anonimato del paciente durante todo el proceso. En caso que Ud. decida ya no participar, podrá solicitar que su muestra sea retirada del estudio sin que esta decisión repercuta en su tratamiento médico.

¿Cuáles son los riesgos para Ud?

La molestia que Ud. sentirá es dolor por el pinchazo de la aguja, podría presentar un moretón en el área donde se le introdujo la aguja.

No es posible conservar totalmente la confidencialidad de su información genética, ya que en el futuro la información del ADN podría ser utilizada para desarrollar otros procedimientos como terapia génica, diseño de medicamentos, estudio de origen de nuestra población, etc; sin embargo, estos riesgos son mínimos en este estudio debido a que nosotros almacenaremos su muestras sólo para estudios de investigación en la enfermedad de Parkinson.

¿Cuáles son los beneficios?

No hay un beneficio directo para Ud. Sin embargo, con los resultados que se obtengan de este estudio, podremos conocer los factores de riesgo genético para la enfermedad de Parkinson en nuestra población y mejorar en el futuro, la prevención y la orientación hacia nuevos tratamiento.

¿Son confidenciales los datos del estudio?

Sí. Todos los hallazgos en este estudio serán confidenciales. Sus datos personales así como la muestra de sangre tendrán un código y no su nombre, los cuales quedarán registrados. Si los resultados de este estudio son publicados, su nombre no aparecerá.

V4 30-04-2013

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Fecha de Aprobación: 06.05.2013
Fecha de Validación: 06.05.2014
Dr. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
Presidente del Comité Institucional de ética en Investigación

Page 2 of 6

Derechos de participantes

Si Ud. tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al Dr. Juan Altamirano, Presidente del Comité Institucional de Ética del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, teléfono 51- 1 4117762.

DECLARACIÓN DEL PARTICIPANTE

Yo, Declaro que he sido informado sobre las características de este estudio, que he podido hacer preguntas y mis dudas han sido resueltas. Sé que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme en cualquier momento. Sé que mi participación contribuirá al mejor conocimiento de la enfermedad sin otro beneficio para mí. Con estos conocimientos:

| Autorizo o doy mi consentimiento para ... | SI | NO |
|---|----|----|
| Que se me extraiga una muestra de sangre para obtención de ADN para investigar la Enfermedad de Parkinson en este estudio. | | |
| Que se me contacte en el futuro en caso de que producto de la investigación se encuentre alguna información de interés para mi caso | | |

PARTICIPANTE

Nombre completo

Firma

Fecha y hora

TESTIGO

Nombre completo

Firma

Fecha y hora

Investigador que toma el consentimiento:

Firma:

Fecha y hora:

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo, como representante legal autorizado y/o familiar responsable del solicitante y consentimiento para participar en investigación.

V4 30-04-2013

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Fecha de Aprobación 06.05.2013
Fecha de Caducidad 06.05.2014
Dr. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación

Page 3 of 6

Nombre completo:
 Firma:
 Fecha y hora:

Revocatoria (retiro) del Consentimiento:

Nombre completo
 Firma
 Fecha y hora:

Sé que este es un estudio que forma parte de un trabajo internacional a nivel latinoamericano, por lo que

| Autorizo o doy mi consentimiento para ... | SI | NO |
|--|--------------------------|--------------------------|
| Que mi muestra forme parte del Consorcio Latinoamericano de Investigación en genética de Enfermedad de Parkinson (LARGE PD) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

PARTICIPANTE
 Nombre completo

Firma

Fecha y hora.....

TESTIGO
 Nombre completo

Firma

Fecha y hora.....

Investigador que toma el consentimiento:

Firma:

Fecha y hora:

Si el solicitante no está capacitado para dar su consentimiento

Yo, como representante legal autorizado y/o familiar responsable del solicitante y consentimiento para participar en investigación.

V4 30-04-2013

MINISTERIO DE SALUD
 Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
 Fecha de Aprobación: 06.05.2013
 Fecha de Caducidad: 06.05.2014
 Dr. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
 Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación

Page 4 of 6

Nombre completo:

Firma:

Fecha y hora:

Revocatoria (retiro) del Consentimiento:

Nombre completo

Firma

Fecha y hora:

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Fecha de Aprobación 06.05.2013
Fecha de Caducidad 06.05.2014

DR. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
Presidente del Comité Institucional de ética en Investigación

PARTICIPACIÓN EN ESTUDIOS POSTERIORES DE INVESTIGACIÓN


Los estudios genéticos, especialmente en enfermedades del sistema nervioso, se realizan continuamente en todo el mundo. Cada día se buscan y encuentran genes involucrados en enfermedades neurológicas. Los resultados se verán mejor en el futuro. Por ello le pedimos permiso para que la muestra de ADN obtenida a partir de su sangre se almacene en el Servicio de neurogenética del Instituto. El propósito es seguir investigando no sólo en la enfermedad de Parkinson, sino en otras enfermedades neurológicas que pudieran tener una explicación genética. Un Comité de Ética en Investigación siempre evaluará y autorizará cualquier investigación que se realice en el futuro. Si Ud. desea pueda autorizar con su firma su participación en estudios posteriores:

Autorizo que mi muestra de sangre sea utilizada en estudios genéticos posteriores relacionados a enfermedad de Parkinson y enfermedades neurológicas.

Participante ó familiar responsable

MINISTERIO DE SALUD
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas
Fecha de Aprobación 06.10.5.1.2013
Fecha de Caducidad 06.10.5.1.2014
Dr. JUAN DE DIOS ALTAMIRANO DEL POZO
Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación

ANEXO 2: Constancia de aprobación ética



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación,
Ciencia y Tecnología - DUICT

CONSTANCIA 205 - 21 - 13

El Presidente del Comité Institucional de Ética (CIE) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética. La aprobación incluyó los documentos finales descritos en anexo a la presente constancia.

Título del proyecto : "Análisis genético por secuenciamiento de genes de riesgo de Enfermedad de Parkinson en población amerindia de Puno-Perú".

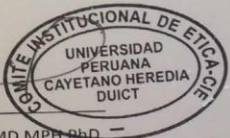
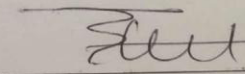
Código de inscripción : 61366

Investigador principal : Mario Reynaldo Cornejo Olivas

La **APROBACION** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **30 de Junio del 2014**. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 01 de Julio del 2013



Fredy Canchihuamán Rivera, MD MPH PhD
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

/fpr

50 AÑOS DE
EXCELENCIA ACADÉMICA Y
A LA VANGUARDIA DE
LA INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31, Perú. Apartado Postal 4314, Lima 100
Teléfono: (511) 319-0000 Anexo: 2271 / 2542 **Telefax:** 482-4541
E-mail: duict@oficinas-upch.pe
Página Web: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/duict/>

ANEXO 3: Compromiso de confidencialidad

Yo,

_____, con DNI No. _____, en mi condición de

_____,

trabajo/asisto/hago una rotación en el Servicio y Laboratorio de Neurogenética del
Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, desde el

_____ hasta el

_____.

Desde el inicio de mi trabajo y en adelante, sin importar en que Institución o dependencia trabaje, me comprometo a guardar confidencialidad y no divulgar bajo cualquier forma de difusión, la información que tenga que manejar como parte de mi permanencia en el Servicio y Laboratorio, incluyendo nombres de las personas e identificación de las familias a las que pertenecen, resultados clínicos y moleculares encontrados, contenido de la consejería genética y otros no directamente especificados en este documento pero que pongan en riesgo la confidencialidad debida a las personas directa o indirectamente afectadas que acuden para atención. Igualmente, me comprometo a guardar confidencialidad bajo las mismas características antes mencionadas, con respecto a las bases de datos y técnicas moleculares que se emplean en el Servicio y Laboratorio y los resultados clínico moleculares disponibles, y a no modificar ni copiar las bases de datos, protocolos clínicos o técnicos y resultados antes mencionados.

Barrios Altos, _____ de _____ del 2013.

ANEXO 4. Diagrama de flujo del estudio de distribución alélica

